

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-67960

⑬ Int. Cl. \*

識別記号

庁内整理番号

⑭公告 平成4年(1992)10月29日

C 12 Q 1/68  
// C 12 N 15/10

A 8114-4B

8828-4B

C 12 N 15/00

A

発明の数 2 (全36頁)

⑮発明の名称 核酸配列の増幅及び検出方法

⑯特 願 昭61-68858

⑰公 開 昭61-274697

⑱出 願 昭61(1986)3月28日

⑲昭61(1986)12月4日

優先権主張 ⑳1985年3月28日㉑米国(U S)㉒716975

㉓1985年10月25日㉔米国(U S)㉕791308

㉖1986年2月7日㉗米国(U S)㉘828144

㉙発 明 者 カリー バンクス マ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94708, ケンジント  
リス ン, ペロイト アベニュー 447

㉚発 明 者 ヘンリー アンソニー アメリカ合衆国, カリフォルニア 94602, オークラン  
エルリツヒ ド, ローダ アベニュー 3936

㉛発 明 者 ノーマン アンヘイム アメリカ合衆国, カリフォルニア 91364, ウッドランド  
ヒルズ, ドウ カルブ 22322

㉜発 明 者 グレン トマス ホー アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エメリービ  
ン ル, アドミラル ドライブ エフ370, 3

㉝発 明 者 ランダル ケイチ サ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94805, リッチモン  
イキ ド, サーティナインズストリート 320

㉞発 明 者 ステファン ジョエル アメリカ合衆国, カリフォルニア 94709, パークレイ,  
スカーフ フランシスコ ストリート20281/2

㉟出 願 人 エフ. ホフマンーラ スイス国, 4002 バーゼル, グレンツアハーシュトラーセ  
ロシュ アクチエンゲ 124  
ゼルシャフト

㊱代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

審 査 官 佐 伯 裕 子

微生物の受託番号 ATCC 39698 ATCC 39699 ATCC 39700 2 ATCC CRL8756

1

2

㊲特許請求の範囲

1 核酸又はその混合物を含むと予想される試料中に少なくとも1種類の特定の核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは核試料中の2種類の異なる核酸配列を区別する方法であつて、まず、前記1種類の核酸配列又は複数種類の核酸配列を、

(a) オリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき核酸配列の鎖について核酸鎖に相補的なプライマーの伸長生成物が合成されるように前記試料を処理し、ここで、前記プライマー

は、特定の核酸配列の鎖に実質的に相補的であり、且つ増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、各プライマーから合成された伸長生成物がその相補体から分離された場合に更なる合成の鑄型として機能するように選択され;

(b) 前記プライマー伸長生成物をそれらが合成された鑄型から分離して単鎖分子を生成せしめ;そして

(c) 段階(b)において生成した各単鎖分子を鑄型として用いてプライマー伸長生成物が合成されるように段階(b)から生じた単鎖分子を段階(a)のプ

3

ライマーにより処理する；

ことを含む段階により増幅し；そして次に

(d) 前記増幅が生じたか否かを決定する；

ことを特徴とする方法。

2 前記増幅が生じたか否かの決定(a)を、

(e) 段階(c)の生成物に、検出されるべき核酸配列について該核酸配列又はその変異体とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドプローブを加え；そして、

(f) 該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する；

ことにより行う、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3 前記オリゴヌクレオチドプローブが標識されている、特許請求の範囲第2項に記載の方法。

4 段階(b)及び(c)を少なくとも1回繰り返す、そしてステップ(a)及び(c)を、プライマーと一緒に又は別に加えられる重合用誘導試薬により処理することによって行う、特許請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載の方法。

5 前記重合用誘導試薬がEコリ (E. coli) DNAポリメラーゼ、EコリDNAポリメラーゼIのKlenow断片、T4DNAポリメラーゼ、熱安定性酵素又は逆転写酵素である、特許請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

6 段階(a)及び(c)を4種類の異なるヌクレオシドトリホスフェートによる処理により行う、特許請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の方法。

7 前記核酸が二本鎖であり、そしてその鎖が段階(a)の前又はその間に変性により分離される、特許請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の方法。

8 前記核酸がDNAであり、そしてプライマーがデオキシリボヌクレオチドである特許請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の方法。

9 使用される各プライマーが、その5'末端に他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を含み、そして段階(c)の後であつて段階(d)の前に該各制限部位に特異的な制限酵素により段階(c)の生成物を開裂させ、該開裂した生成物を開裂していない生成物と分離し、そして段階(d)で使用する、特許請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の方法。

4

10 前記特定の核酸配列が遺伝子性疾患、癌性疾患又は伝染性疾患と関連している、特許請求の範囲第1項～第9項のいずれか1項に記載の方法。

5 11 前記段階(b)及び(c)を少なくとも10回反復する、特許請求の範囲第1項～第10項のいずれか1項に記載の方法。

12 前記熱安定性酵素が熱安定性DNAポリメラーゼである、特許請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項に記載の方法。

13 前記段階(a)及び(c)におけるプライマーがそれぞれ少なくとも1000:1のプライマー:相補的鎖の比率で存在する、特許請求の範囲第1項～第12項のいずれか1項に記載の方法。

15 14 前記段階(a)及び(c)におけるプライマーがそれぞれ少なくとも10<sup>6</sup>:1のプライマー:相補的鎖の比率で存在する、特許請求の範囲第13項に記載の方法。

20 15 前記核酸が、単鎖RNA又は単鎖DNAから合成される特許請求の範囲第1項～第14項のいずれか1項に記載の方法。

16 前記RNAがメッセンジャーRNAである特許請求の範囲第15項に記載の方法。

25 17 1種類又は2種類以上の核酸を含むと予想される試料中の少なくとも1つの特定の核酸配列をプローブにより検出するための、

検出されるべき核酸配列についてのオリゴヌクレオチドプライマーであつて、特定の核酸配列の鎖に実質的に相補的であり、且つ検出されるべき特定の核酸配列の両端を規定し、1つのプライマーから合成された伸長生成物がその相補体から分離されたときに更なる合成用の鋳型として機能することができるプライマーを有するキット。

35 18 重合用誘導試薬をさらに含んで成る、特許請求の範囲第17項に記載のキット。

19 前記誘導剤がDNAポリメラーゼである特許請求の範囲第17項に記載のキット。

20 4種類の異なるヌクレオシドトリホスフェートをさらに含んで成る特許請求の範囲第18項又は第19項に記載のキット。

21 前記プローブと前記核酸配列とのハイブリダイゼーションを検出するための手段をさらに含んで成る、特許請求の範囲第17項～第20項の

いずれか1項に記載のキット。

#### 発明の詳細な説明

##### 〔産業上の利用分野〕

本発明は、もしテスト試料中に存在するならばその存在する核酸配列を増幅し、プローブを用いてそれを検出するための方法に関する。より詳細には本発明は、与えられたDNA又はRNA配列から初期に存在する量に比較してより大量の任意の特定の核酸配列を生成せしめ、該配列の検出を容易にする方法に関する。該DNA又はRNAは単鎖又は二重鎖であつてもよく、比較的純粋であつても核酸の混合物の成分であつてもよい。本発明の方法では、所望の核酸配列の増幅を達成するために反応を繰返し行うようにする。

##### 〔従来の技術〕

特に診断上の用途のためには、標的核酸配列は問題のDNA又はRNAのほんの僅かな部分であることがあり、非同位体標識又は末端標識オリゴヌクレオチドプローブを使用するのではその存在を検出することは困難である。プローブ検出システムの感度を向上させるために多くの労力が費やされているが、現在利用できる方法を用いて容易に検出できるに十分な量を得るために、標的配列を増幅するような研究は殆ど行われていない。

核酸を初めから、あるいは既存の配列から合成する方法がいくつかの文献に記載されている。これらの方法は、完全に特定された配列の与えられた核酸を大量に生産することを可能にするものである。

核酸を初めから合成する1つの既知方法は、ヌクレオシド誘導体からの核酸の有機合成を含むものである。この合成は溶液中又は固体担体上で行われる。有機合成の1つのタイプはリン酸トリエステル法であり、これは遺伝子断片又は短い遺伝子を調製するために利用される。リン酸トリエステル法では、オリゴヌクレオチドが調製され、次にこれは結合されてより長鎖の核酸を形成する。この方法は、S.A.ナーランクらにより、Meth. Enzymol. 68巻90頁(1979年)及び米国特許第4356270号に開示されている。該特許は、ソマ

スタチン遺伝子の合成とクローニングを開示している。

有機合成の第2のタイプはリン酸ジエステル法であり、これはトランスファーRNA遺伝子の調

製に利用されている。この方法はE.L.ブラウンらによりBeth. Enzymol. 68巻109頁(1979年)に開示されている。リン酸トリエステル法と同じように、リン酸ジエステル法もオリゴヌクレオチドの合成を含み、これらが実質的に結合されて所望の核酸が形成される。

上記した初めからの合成法は核酸の長鎖を合成するために利用されるが、核酸を大量合成するための実用的方法ではない。両法とも労力と時間を消費し高価な装置と試薬を必要としかつ全体収率が低い。全体収率が低いのは、オリゴヌクレオチドの合成とそれらを結合する反応が非効率的であることに起因する。長鎖の核酸を合成する際あるいは短鎖の核酸を大量に合成する場合でさえも、多くのオリゴヌクレオチドを合成し多くの結合反応を行うことが要求される。従つてこれらの方法は任意で所望の核酸を大量に合成するには実用的ではない。

初めに存在する少量の核酸から大量の核酸を生産する方法も存在する。これらの方法は好適な宿主系内での核酸のクローニングを含み、ここでは所望の核酸は宿主の形質変換に使用される好適なベクター中に挿入される。宿主が培養されるとベクターが複製され、所望の核酸のコピーが生産される。核酸断片のサブクローニングについては、T.マニアチスらにより、コールド・スプリング・ラボラトリーのMolecular Cloning 390-401頁(1982年)に簡単に記述されている。この技術については米国特許第4416988号及び4403036号にも述べられている。

米国特許第4293652号に記載されている核酸の第3の合成法は、上述の有機合成と分子クローニング法を合わせたものである。該法では、所望の核酸配列を作り上げるのに必要な好適な数のオリゴヌクレオチドを初めに合成し、次にこれらを次の挿入の前に増殖により増幅されるベクターに挿入する。

##### 〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明は、この分子クローニング法に幾らかの類似性を有している。しかし本発明はいかなる生物の繁殖をも含まず、従つて繁殖に伴つて起こり得る危険や不都合を回避することができる。本発明は所望の核酸と関連しない核酸の合成を必要とせず、従つて本発明によれば複雑な生物学的混合

物からコストをかけて生成物を精製することも回避できる。

本発明はプライマーと重合試薬を用いて1種の核酸又は複数の核酸の混合物中に存在する1又は2以上の特定の核酸配列を増幅し、かつ増幅した配列を検出する方法である。プライマーは増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、そして1つのプライマーの伸長生成物は、他のプライマーとハイブリダイズしたときに所望の特定の核酸配列の生成のための鋳型となり、又その逆も起こる。そしてこのプロセスは所定量の配列が生成するまで必要なだけ繰り返される。標的配列から大量の核酸を比較的短時間で生産するためには、本方法は上の従来法より効率的であると期待される。本方法は核酸混合物に僅かしか含まれていない核酸種を増幅し、該種を効率的に検出するために特に有用である。

#### 〔問題点を解決するための手段〕

更に特定すると、本発明は、核酸又はその混合物を含むと予想される試料中に少なくとも1種類の特定の核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは核試料中の2種類の異なる核酸配列を区別する方法であつて、まず、前記1種類の核酸配列又は複数種類の核酸配列を、

- (a) オリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき核酸配列の鎖について該核酸鎖に相補的なプライマーの伸長生成物が合成されるように前記試料を処理し、ここで、前記プライマーは、特定の核酸配列の鎖に実質的に相補的であり、且つ増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、各プライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された場合に更なる合成の鋳型として機能するように選択され；
  - (b) 前記プライマー伸長生成物をそれらが合成された鋳型から分離して単鎖分子を生成せしめ；そして
  - (c) 段階(b)において生成した各単鎖を鋳型として用いてプライマー伸長生成物が合成されるように段階(b)から生じた単鎖分子を段階(a)のプライマーにより処理する；
  - ことを含む段階により増幅し；そして次に
  - (d) 前記増幅が生じたか否かを決定する；
  - ことを含んで成る方法、を提供する。
- 本発明はさらに、1種類又は2種類以上の核酸

を含むと予想される試料中の少なくとも1つの特定の核酸配列をプローブにより検出するための、

検出されるべき核酸配列についてのオリゴヌクレオチドプライマーであつて、特定の核酸配列の鎖に実質的に相補的であり、且つ検出されるべき特定の核酸配列の両端を規定し、1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに更なる合成用の鋳型として機能することができるプライマー

を有するキット、を提供する。

このキットはさらに、重合用誘導試薬、4種類の異なるヌクレオシドトリホスフェート及び／又はハイブリダイゼーションを検出するための手段を含むことができる。

#### 〔具体的な説明〕

プライマー、プローブ、検出すべきオリゴマー断片、オリゴマー対照体、及び標識されていないプロッキングオリゴマーに関して使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、2又はそれ以上の好ましくは3より多くのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから成る分子として定義される。その正確な大きさは多くの因子に依存し、その因子はオリゴヌクレオチドの究極的な機能と用途に依存する。

ここで使用される「プライマー」という用語は、精製された制限消化物として自然に存在しあるいは合成的に調製されたオリゴヌクレオチドを意味し、このプライマーは、例えば好適な温度及びpHでヌクレオチドとDNAポリメラーゼのような重合試薬が存在するような、核酸鎖に相補的なプライマーの伸長生成物の合成が誘発される条件下に置かれたときに合成開始点として機能することができる。該プライマーは増幅効率を最大にするため単鎖であることが好ましいが、その代わりに二重鎖であつてもよい。二重鎖であると、プライマーは伸長生成物を調製するために使用される前にまずその鎖を分離するために処理される。プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドであることが好ましい。プライマーは、重合試薬の存在下で伸長生成物の合成を開始するために十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度やプライマー源を含む多くの因子に依存する。例えば、目的とする配列の複雑さに依存してオリゴヌクレオチドプライマーは典型的には15

から25又はそれより多くのヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドを含むものであつてもよい。短いプライマー分子は、鋳型とともに十分安定なハイブリドの複合体を形成するために、より低い温度を要求する。

プライマーは増幅されるべき各特定配列の異なる鎖と「実質的」に相補的であるように選択される。このことはプライマーはそれぞれの鎖とハイブリダイズするに十分に相補的でなければならぬことを意味する。従つてプライマーの配列は鋳型の配列を正確に反映する必要はない。例えば相補的でないヌクレオチド断片を、プライマーの配列の残部が鎖に相補的であるようにプライマーの5'末端に結合させてもよい。代わりに、プライマーの配列が増幅されるべき鎖の配列と十分な相補性を有してそれらとハイブリダイズし、それによつて他方のプライマーの伸長生成物合成用鋳型を形成するならば、相補的でない塩基又はより長い配列がプライマー内に散在してもよい。

本発明で使用される「制限エンドヌクレアーゼ」及び「制限酵素」という用語は、二重鎖DNAを特定の核酸配列又はその近傍で切断するような細菌性酵素を意味する。

本発明で使用される「DNAの多形現象」という用語は、DNA中の特定部位に2又はそれより多くの異なつたヌクレオチド配列が存在できる状態を意味する。

「制限断片長さの多形現象 (RALP)」という用語は、特定の制限エンドヌクレアーゼによる消化により形成される制限断片の長さに個体間の相違があることを意味する。

本発明は、核酸中に存在すると思われる1又はそれ以上の所望の特定の核酸配列を増幅する方法に関する。本法によれば大量の特定の配列を調製できるので、本発明はDNA又はメッセンジャーRNAのクローニング効率を改良し、かつ標的配列を増幅してその検出を容易にするために使用することができる。

一般に、本発明の方法は、用いられる反応ステップの数に関連して指數的な収量で少なくとも1つの特定の核酸配列を生産する連鎖反応を含み、該配列は(a)必要とされる末端が、それとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成できるに十分な程度に詳細に知られており、(b)連鎖反応を開

始するための配列が入手可能であることが条件となる。連鎖反応で得られる生成物は、使用した特定のプライマーの末端に対応する末端を有するような個別的な核酸のデュプレックスである。

5 精製された状態でも精製されていない状態でもよい任意の核酸源を、所望の特定の核酸配列を含むと思われるのであれば、出発核酸として使用できる。従つて本法では、例えば単鎖であつても二重鎖であつてもよいDNA又はRNA例えばメッセンジャーRNAを使用することができる。更にそれぞれ1つの鎖を含むDNA-RNAのハイブリドを使用してもよい。これらの核酸の混合物を使用してもよく、又先行する増幅反応において同じか又は異なつたプライマーを用いて生産された核酸15 を使用してもよい。増幅すべき特定の核酸配列は大きな分の一部であつてもよく、特定の配列が核酸全体を構成するようにはじめから個別的な分子として存在していてもよい。増幅すべき配列は初めから純粋な状態で存在する必要はなく、該配列は、複雑な混合物の小部分、例えば全ヒトDNA中のβ-グロビン遺伝子、又は特定の生物的試料の極く僅かの部分のみを構成する特定の微生物に起因する核酸配列の部分であつてもよい。出発物質としての核酸は、同じか又は異なつた2以上の所望の特定の核酸配列を含んでいてもよい。従つて本発明の方法は、1つの特定の核酸配列を大量に生産するだけでなく、同じか又は異なつた核酸分子上に位置する2以上の異なつた特定の核酸配列の同時増幅にも有用である。

30 核酸は、例えばpBR322のようなプラスミド、クローン化されたDNA又はRNA、又は細菌、酵母、ビールス及び植物や動物などの高級生物等の自然にあるDNA又はRNA等の任意源から得ることができる。DNA又はRNAは、例えばマニアチスらによりMolecular Cloningの280から281頁(1982年)に記載されているような種々の技術により、血や絨毛又は羊膜細胞等の組織物質から抽出することができる。

40 本発明方法により、任意の特定の核酸配列を生産することができる。配列の両末端の十分な数の塩基が十分詳細に分かつており、これにより所望の配列の異なつた複数の鎖に対し、かつ該配列に沿つた次のような相対位置にハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドプライマーを調製する



ことができればよく、すなわち、1つのプライマーから合成伸長した生成物が、鋳型（相補体）から分離されたときに、限定された長さの核酸に他のプライマーを伸長させるための鋳型としての役割を果たせばよい。配列の両末端の塩基に関する知識が増加するほど目的とする核酸配列のためのプライマーの特異性も大きくなり、従って本法の有効性も大きくなる。以後使用するプライマーという用語は、特に増幅すべき断片の末端配列に関する情報にいくらかの曖昧さがある場合には、1より大きい数のプライマーを意味するものと理解されるべきである。例えば、核酸配列が蛋白質配列の情報から推測できる場合、遺伝子コードの縮重に起因する全ての可能なコドン変化を示す配列を含むプライマーを集めて各鎖用として使用する。このような集合のうちの1つのプライマーは、増幅すべき所望配列の末端と一致する。

オリゴヌクレオチドプライマーは任意の好適な方法、例えば上記したリン酸トリエステル法及びリン酸ジエステル法又はそれらのオートメーション化された方法を使用して調製することができる。このようなオートメーション化された方法のうちの1つによれば、ビューケージらにより Tetrahedron Letters 22巻1859-1862頁に記載されている通り、ジエチルフルオロオロアミダイトを出発物質として使用して合成することができる。修飾された固体担体上でのオリゴヌクレオチド合成の1つの方法が米国特許第4458066号に記載されている。生物源（例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物）から分離したプライマーを使用することも可能である。

特定の核酸配列は、該配列を鋳型として含む核酸を使用して生産される。核酸が2つの鎖を含んでいるときは、別のステップとしてでもプライマーの伸長生成物の合成と同時でもよいが、該核酸は鋳型として使用される前に鎖を分離する必要がある。この鎖分離は、物理的、化学的及び酵素的方法を含む任意の好適な変性法により行うことができる。核酸の鎖を分離する1つの物理的方法は、完全に（99%以上）変性されるまで核酸を加熱することを含む。典型的な加熱変性は80から150℃で1から10分間加熱することを含む。鎖の分離は、ヘリカーゼ、又はヘリカーゼ活性を有しリボATPの存在下でDNAを変性させるものとし

て知られる酵素RecAとして知られる酵素類からの1酵素により誘発させることもできる。ヘリカーゼで核酸の鎖を分離するのに好適な反応条件はクーン ホフマン ベーリングにより CSH Quantitative Biologyの43から63頁（1978年）に記載され、RecAを使用する技術は、C. ラディングにより Ann. Rev. Geneticsの16巻405から437頁に記載されている。

増幅すべき配列を含む当初の核酸が単鎖であるとき、その相補体をそれに1つ又は2つのオリゴヌクレオチドプライマーを加えて合成する。好適な単一プライマーが加えられると、プライマー、重合試薬及び後述する4つのヌクレオチドの存在下でプライマーの伸長生成物が合成される。生成物は部分的に単鎖の核酸と相補的で、核酸鎖とハイブリダイズして長さの異なるデュプレックスを形成し、これは上記した通り単鎖に分離され、相補的な2つの分離された鎖となる。代わりに2つの好適なプライマーを単鎖に加えて反応を行うこともできる。

当初の核酸が増幅すべき配列を構成するならば、プライマーの伸長生成物は当初の核酸の鎖と完全に相補的となり、ハイブリダイズして同じ長さの鎖から成るデュプレックスを形成し、これは分離されて単鎖の分子となる。

核酸の相補的な鎖が分離すると、当初の核酸が二重鎖であつても単鎖であつても、その鎖は他の核酸鎖の合成用鋳型として容易に使用することができる。この合成は任意の好適な方法を用いて行うことができる。通常それは好ましくはpHが7から9、最も好ましくは8である緩衝水溶液中で起こる。好ましくは過剰のモル比（クローン化された核酸については、通常プライマー対鋳型が1000:1、そしてゲノムの核酸については通常プライマー対鋳型が $10^5$ :1）の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを分離された鋳型鎖を含む緩衝水溶液に加える。しかし本法を診断的用途に使用する場合には相補的な鎖の量は既知ではないことを理解すべきであり、従って相補的な鎖の量に関連するプライマーの量を確信をもって決定することはできない。しかし実際には、増幅すべき配列が複雑な長鎖の核酸鎖の混合物中に含まれる場合には、加えられるプライマーの量は相補的な鎖（鋳型）の量よりも通常モル過剰とする。本法

の効率を改良するためには、大きな過剰モル比とすることが好ましい。

デオキシリボヌクレオシド三リン酸であるデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPの十分な量も合成混合物に加え、生成する溶液を約90-100℃で約1から10分、好ましくは1から4分間加熱する。この加熱時間の後、溶液の温度をプライマーのハイブリダイゼーションに好適な20-40℃まで下げる。この冷却した混合物に重合試薬を加え、従来知られている条件下で反応を行わせる。この合成反応は、室温からそれを越えると重合試薬が効率的に機能しない温度までの間で行わせることができる。従って例えばDNAポリメラーゼを重合試薬として使用するとき、温度を通常45℃以上に上昇させない。シグナルを検出するのに有効な量のジメチルスルフォキシド (DMSO) を存在させ、又は温度を35-40℃とすることが好ましい。最も好ましいのは、5-10容量%のDMSOを存在させ、温度を35-40℃とすることである。増幅すべき配列がHLA DQ- $\alpha$ 又は $\beta$ 遺伝子のような110を超える塩基対断片であるような用途の場合には、有効量(例えば10容量%)のDMSOを増幅用混合物に加えかつ反応を35-40℃で行って、検出できる結果を得るか又はクローニングを可能にする。

重合試薬は、プライマーの伸長生成物の合成を達成できるものならば、酵素を含むどのような化合物でも系でもよい。この目的のための好適な酵素は、例えばEコーリーDNAポリメラーゼI、EコーリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片、T4DNAポリメラーゼ、他の入手できるDNAポリメラーゼ、逆転写酵素及び耐熱性酵素を含む他の酵素を含み、これらは好適な懸液中でヌクレオチドの結合を促進し、各核酸鎖と相補的であるプライマーの伸長生成物を形成する。一般に合成は各プライマーの3'末端から始まり、合成が終了するまで鋳型鎖に沿って5'末端方向に向かって進行し、異なった長さの分子を生成する。しかし上述の方法と同じ方法を用いて5'末端で合成を始め、他の方向に向かって反応を進行させる試薬がある。

新たに合成された鎖とそれと相補性を有する核酸鎖は、本法のその後のステップにおいて使用される二重鎖分子を形成する。次のステップでは、

二重鎖分子の鎖は上述の任意の手順を用いて分離され、単鎖分子を提供する。

新たな核酸が該単鎖分子上で合成される。追加の誘導試薬、ヌクレオチド及びプライマーを、上記に規定した条件下で反応を進行させるために必要ならば加えてもよい。オリゴヌクレオチドプライマーの一末端から再度合成が始まり、そして鋳型の単鎖に沿って進行して他の核酸を生成する。このステップの後における伸長生成物の半分は2つのプライマーが結合した特定の核酸配列から成っている。

鎖分離と伸長生成物合成のステップは、特定の核酸配列を所定量生産するまで必要なだけの回数繰り返すことができる。後により詳細に記載するように、特定の核酸配列は指数的に蓄積する。

最初の核酸又は核酸の混合物から2以上の特定の核酸配列を生産することが望ましい場合は、好適な数の異なったオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。例えば2つの異なった特定の核酸配列を生産する場合には、4つのプライマーを使用する。プライマーのうちの2つは特定の核酸配列のうちの1つに関するもので、他の2つのプライマーは第2の特定の核酸配列に関するものである。これにより、2つの異なった特定の配列が本法を用いて指数的に生産され得る。本発明は、各ステップ後に新しい試薬を加える段階的方法、又は全ての試薬を初期のステップで加える同時的方法、又はある与えられた数のステップの後に新しい試薬を加える一部段階的で一部同時的方法のいずれによつても行うことができる。熱処理のように重合試薬を不活性化する鎖分離方法を採用した場合には、熱に対して不安定である酵素の場合がそうであるように、各鎖分離ステップ後に重合試薬を補充することが必要である。ヘリカーゼのような酵素的手段を含む多数の精製された成分を鎖分離ステップで使用する場合は、同時的方法を使用することができる。同時的方法では、反応混合物は、所望の配列を含む核酸鎖の他に、鎖分離酵素(例えばヘリカーゼ)、rATPのような鎖分離酵素への適切なエネルギー供給源、4つのヌクレオチド、モル過剰のオリゴヌクレオチドプライマー及びEコーリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片のような誘導試薬を含むことができる。同時的方法で変性のために熱を使用するとき



は、誘導試薬に依存するが好ましくは65-90℃の高温で機能する熱安定性ポリメラーゼ等の熱安定性誘導試薬を使用し、この温度で核酸は平衡状態にある単鎖と二重鎖から成っている。長さの短い核酸には、約50℃程度の低温が採用される。どの程度

の高温が使用できるかは、その温度で酵素が失活するかあるいはプライマーのハイブリダイゼーションが不十分な程度しか起こらないかどうか

に依存する。このような熱安定性酵素は、例えばA.S. カレディンらにより Biokhimiya 45巻644-651頁 (1980年) に記載されている。本法の各ステップは、全ての試薬が始めから存在するにもかかわらず、続いて起こる。必要ならば追加の試薬を加えてもよい。適切な長さの時間が経過して所望量の特定の核酸配列が生成した後、任意の公知方法で酵素を失活させるか反応成分を分離するかして反応を停止させる。

本発明方法は連続的に行ってもよい。オートメーション化された方法の一態様として、反応を、変性区域、試薬添加区域及び反応区域を通じてサイクルさせるような方法がある。他の態様では、プライマーの伸長生成物の合成に使用する酵素を

カラム中で固定化することができる。他の反応成分は連続するカラムと加熱用コイルを通るように

ポンプを使つて連続的に循環され、これにより、

増幅される特定の配列(S)は、次のように図示される。

(S<sup>+</sup>) 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'

(S<sup>-</sup>) 3' TTTTTTTTTYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

好適なオリゴヌクレオチドプライマーは、

プライマー 1 : GGGGGGGGGG

プライマー 2 : AAAAAAAAAA

であり、もし(S)を含むDNA :

....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZ....

....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTTTTYYYYYYYGGGGGGGGGGZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZ....

生成した核酸が酵素を失活させることなく繰り返して変性される。

本発明の概略が下記に示され、ここでは相補的な鎖(S<sup>+</sup>)と(S<sup>-</sup>)から成る所望配列(S)を含む二重鎖DNAが核酸として使用されている。第1の及び引き続いて起こる反応サイクルでは、当初の鋳型上の各オリゴヌクレオチドプライマーの伸長は、プライマーの1つとともにのみ終了する制限のない長さの、1つの新しいssDNA分子生成物を生成する。以後「長鎖生成物」と呼ぶこれらの生成物は直線的に蓄積し、つまり任意数のサイクルの後に存在する量はサイクル数に比例する。

このように生産される長鎖生成物は、引き続いて起こるサイクルの間一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの鋳型として機能し、所望配列(S<sup>+</sup>)又は(S<sup>-</sup>)の分子を生成する。これらの分子も一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの鋳型として機能し、更に他の(S<sup>+</sup>)及び(S<sup>-</sup>)を生成し、従つてサイクル数に関連して指數的に(S)の蓄積を生じさせる連鎖反応が維持される。

オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションにより形成される意図されない副生成物は、それ自身触媒活性がなく(稀な例を除く)、従つて直線的に蓄積する。

18

伸長方向 ←  $\begin{array}{c} 3' \quad 5' \\ \text{GGGGGGGGGG} \end{array}$  プライマー 1

## 最初の鋳型鎖

プライマー 2    AAAAAAAAAA     $\longrightarrow$  伸長方向  
                  5'            3'

**3' .....zzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTyyyyyyyyyyggggggggggg 5'**

5' .....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZZZ..... 3'

最初の鋳型鎖+

[illegible]

53  
AAAAAAAAAXXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZZ....  
新しく合成された長い生成物2

上記4つの鎖が次のサイクルにおいてプライマー1及び2と再ハイブリダイズすれば、重合剤は次の反応を触媒する。

プライマー-2    5' AAAAAAAAAA  $\longrightarrow$  伸長の方向

**3'....zzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'**  
新しく合成された長い生成物！

伸長の方 向 ← ————— GGGGGGGGGG 5' プライマー 1

5....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZ...3  
最初の鋳造箱+

プライマー-2 5' AAAAAAAAAA  $\longrightarrow$  伸長の方向

3...ZZZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTTTTYYYYYYYYYYGGGGGGGGGGZZZZZZZZZZ... 5'

最初の鋳型鎖

ここまで伸長 ← GGGGGGGGGG 5' プライマー1

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZ. 3'  
新しく合成された長い生成物2

19

20

上記4つのデュプレックスが分離されると次の鎖が生ずる。

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'  
新しく合成された(S<sup>+</sup>)

3' ....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

第1サイクルで合成された長い生成物1

3' ....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

新しく合成された長い生成物1

5' ....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZ.... 3'

最初の鋳型鎖<sup>+</sup>

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZZZ.... 3'

新しく合成された長い生成物2

3' ...ZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGZZZZZZZZZZZZZZZZ... 5'

最初の鋳型鎖<sup>-</sup>

3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

新しく合成された(S<sup>-</sup>)

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZZZ.... 3'

第1サイクルで合成された長い生成物2

一方のプライマーのオリゴヌクレオチド配列と  
共に終る鎖及び他方の相補的配列の各鎖は、生産  
することが望まれている特定の核酸配列〔S〕で  
あることが分かる。 20

本法のステップは、プライマー1及び2、重合  
試薬及び存在するヌクレオチドの量によつてのみ  
限定される以外、無限に繰り返すことができる。  
検出のためには、例えば試料の特性に依存する量 25  
である検出できるシグナルを発生させるために要  
求される回数のサイクルを実施する。例えば試料  
が純粋か希釈されたものならば、複雑な混合物で  
あるものよりも、少ない回数しか要求されない。  
試料がヒトのゲノムDNAであると、サイクルの 30  
回数は、約10-15回が好ましい。

最初の核酸は複製されないで、その量は全工  
程中一定である。長鎖生成物は最初の核酸からの  
み生産されるので、その量は直線的に増加する。  
特定の配列の量は指数的に増加する。従つて特定  
の配列はその量が増加して優勢な成分となる。こ  
のことは次表に示され、該表は各サイクルの効率  
が100%であるとした場合のnサイクル後の理論  
的に存在する成分量を比較したものである。 35

サイク ル数	0からnサイクル 後の二重鎖の数		
	鋳型	長鎖生 成物	特定配列 〔S〕
0	1	—	—
1	1	1	0
2	1	2	1
3	1	3	4
5	1	5	26
10	1	10	1013
15	1	15	32752
20	1	20	1048555
n	1	n	2 <sup>n</sup> - n - 1

単鎖の核酸を鋳型として使用すると、サイクル  
あたり1つの長鎖生成物が生成する。

本法は好適な発現ベクターに特定の核酸配列を  
挿入するためにクローン化するのに使用できる。  
該ベクターは適切な宿主生物を形質転換して標準  
的な組み換え体DNA技術により遺伝子生成物を  
生産する際に使用できる。 40

通常このようなクローニングはベクターへの直  
接の連結反応又はオリゴヌクレオチドリンカーの  
付加とそれに引き続く制限酵素による開裂を含ん  
でいる。しかし両法とも反応性が不十分である平  
滑末端の連結反応を含んでいる。更に両法ともク  
ローニングベクターへの増幅された生成物を挿入  
する際の位置とその数を制御することができな

い。

本増幅工程では、最初の鋳型核酸、期待される標的増幅生成物及び種々のバックラウンド非標的生成物に由来する核酸の混合物が得られる。最初の鋳型DNAが、例えばヘテロ接合二量体遺伝子中におけるような多数の標的配列を含むか、又は一連の関連した遺伝子群がある場合にも、増幅された生成物は混合物となる。

本法のプライマーを、増幅反応で生産されるDNA混合物の迅速かつ特異的なクローニングを補助するために修飾してもよい。このような修飾では、同じか又は異なつた制限部位がプライマーの5'末端に導入されて増幅された生成物の2つの末端に制限部位が生じる。好適な酵素で切断すると、増幅された生成物は容易にプラスミド又はベクター中に挿入されクローニングされる。このクローニングは、混合物ではなく、個々の増幅された生成物の分析又は発現を可能にする。

同じ制限部位を両プライマーに使用することができるが、異なつた制限部位を使用すると生成物を特定の方向にベクターに挿入することができ、かつ2つのプライマーのうちの1つのみに起因する増幅から生ずる挿入だけでなく多数の挿入も抑制することができる。単鎖配列決定用ベクターへクローニングする場合、単鎖ハイブリダイゼーションプローブが使用される場合、及びクローン化された生成物が発現されるべき場合には、特定方向へ挿入することが有用である。

プライマーを調製する1つの方法は、標的配列と僅かしか異ならないプライマー配列を選択することである。各プライマーが位置すべき領域は、所望のベクターに好適な制限部位に相同であるようにスクリーニングされる。例えば“CAGTATCCGA……”という標的配列は、BamHI部位を含む配列と僅かに一塩基が異なるにすぎない。プライマー配列はその3'末端において目的物に正確にマッチしかつその5'末端の近傍に変形した配列と制限部位を有するように選択される(例えば“CAGgATCCGA…”の小文字は標的配列とマッチしていないことを意味する)。この僅かに変化した配列は最初の標的配列とハイブリダイズし重合を開始するプライマーの能力を妨げるものではない。第1の増幅サイクルの後、プライマーはコピーされ、標的となり、かつ新し

いプライマーと正確にマッチする。増幅工程後、生成物は適切な制限酵素で開裂され、そして必要ならば脱塩カラム又は分子量クロマトグラフィーカラムを通してヌクレオチド三リン酸や塩等の連結阻害剤を分離され、そして連結反応によりバクテリオファージM13のようなクローニングベクターに挿入される。遺伝子は、周知の技術を用いて配列決定され、そして/又は発現される。

プライマーを調製する第2の方法は、プライマーの3'末端を標的配列から採用し、そしてプライマーの5'末端に所望の制限部位を付加することを含む。この例として Hind III 部位が配列“cgaagctt CAGTATCCGA……”を形成することにより付加され、ここで小文字の意味は上記の通りである。加えられた塩基は増幅の第1サイクルのハイブリダイゼーションには寄与しないが、その後のサイクルにおいてマッチする。増幅された最終生成物は制限酵素で切断され、上記の通りクローニングされ、そして発現される。増幅される遺伝子は、例えばヒトの $\beta$ -グロビン、又はヒトのHLA DQ、DRもしくはDP- $\alpha$ 及び $\beta$ 遺伝子である。

更に本法はインビトロの突然変異用として使用することができる。オリゴデオキシリボヌクレオチドは増幅されるべきDNA配列と正確に相補的である必要はない。これらは、ポリメラーゼ酵素や他に使用されるいずれかの誘導試薬によつて伸長されるために十分な程度に、鎖とハイブリダイズすることができればよい。使用するプライマーが最初の鋳型と正確に相補的でない場合のポリメラーゼ連鎖反応の生成物は鋳型よりむしろプライマー配列を有し、これによりインビトロの突然変異を可能にする。引き続くサイクルでは、より以上のミスペアプライミングが必要とされないの

で、この突然変異が減ることのない効率下で増幅される。このように生産された突然変異体は標準的な分子生物学的技術により適切なベクター中へ挿入され、変化した蛋白質を生産する能力等の変化した特質をこのベクターに与える。

上述した変化したDNA配列を形成する方法は、より以上の配列変化を誘発させるために異なつたプライマーを使用して該変化したDNAに対して繰り返すことができる。この方法では、一連の突然変異配列が徐々に生成され、ここでこの一連の

ものに新しく加えられるものは、最後のものと僅かに異なることができるが、最初のDNA源配列とは非常に大きく異なることができる。この方法では、非常に大きなミスマッチの場合にプライマーが機能しないために単一ステップでは行うことのできない変化を、最終的には作り出すことができる。

更に、十分な量のプライマーが増幅される鎖に相補的である配列を含むのであれば、プライマーはその配列の一部として相補的でない配列を含むことができる。例えば鋳型配列に相補的でない核酸配列（例えばプロモーター、リンカー、コード配列等）を、1つ又は両方のプライマーの5'末端に結合させることができ、これにより増幅工程の生成物にこれを付加することができる。伸長プライマーを添加した後、相補的でない核酸挿入部を含む新しい鋳型の所望量を得るために十分な数のサイクルを実施する。これにより簡単な技術を用いて比較的短時間（例えば2時間又はそれ以下）内に組合わされた断片を大量に生産することが可能になる。

更に本法においては、最初の短い核酸断片の鎖を分離することにより生成する単鎖の3'末端に相補的かあるいは実質的に相補的である3'末端を有し、かつ5'末端が中央切片に付加されるべき配列の情報を含むものであるプライマーを使用して、生成物より短鎖である既存の核酸断片（これを中央セグメントという）から核酸断片を合成することができる。この方法は、

(a) 各核酸鎖に相補的である、各プライマーの伸長生成物が合成される条件下で、該既存の断片の鎖を2つのオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、ここで該2つのプライマーは、一方のプライマーから合成される伸長生成物とその相補体から分離されたときに他方のプライマーの伸長生成物の合成のための鋳型としての役割を果たすことができるように、前記既存断片の各鎖の3'末端と実質的に相補的であるように選択され、そして各プライマーはその5'末端において前記既存断片と相補的でなくかつ合成される核酸断片の2つの末端に対応するヌクレオチド配列を含むものであり；

(b) その上でプライマーの伸長生成物が合成された鋳型からプライマーの伸長生成物を分離して

単鎖分子を生成せしめ；

(c) ステップ(b)から生じた単鎖分子をステップ(a)のプライマーにより、ステップ(b)において生成した各単鎖をプライマーとして用いてプライマー伸長生成物が合成される条件下で処理し、こうして2つの中間二重鎖核酸分子（このそれぞれには、オリゴヌクレオチド鋳型の一方の5'末端に存在する核酸配列が導入されている）と2つの十分に長い二重鎖核酸分子（このそれぞれに、オリゴヌクレオチドプライマーの両者の5'末端に存在するヌクレオチド配列が導入されている）を生成せしめ；

(d) 前記十分な長さの二重鎖分子の有効量を生産するのに十分な回数ステップ(b)とステップ(c)を繰り返す；

(e) ステップ(d)の生成物の鎖を2つのプライマーで処理して、ステップ(d)の生成物が両末端において伸びるようにし；そして

(f) 中央セグメントとしてのステップ(d)の生成物及びステップ(d)の生成物の鎖を分離することにより生成する単鎖の3'末端と相補的か実質的に相補的である2つのオリゴヌクレオチドプライマーをして使用しながらステップ(a)からステップ(d)までを繰り返す；

ことから成る方法である。

ステップ(b)とステップ(c)は必要なだけ通常少なくとも5回繰り返して、最終生成物を合成するために必要な量（すなわち、有効量）の十分に長い二重鎖生成物を生産する。更に中央のセグメントを、先行する増幅サイクルの生成物として得ることができる。ステップ(d)の生成物は伸長又は増幅の新たなサイクルの前に精製され、又は生成物を含む反応混合物とし直接使用する。

プライマーの3'末端が最初の一層短い鎖の核酸の単鎖の3'末端と正確に相補的でないときは、生成物の中央のセグメントは該最初の一層短い鎖の核酸にある配列情報と正確に同じではない。従って最初の核酸の変異体を、その3'末端が最初の一層短い鎖の核酸の単鎖の3'末端と実質的に相補的であるプライマーを用いて作り出すことができる。

制限部位リンカーがプライマーに導入されると、増幅された二重鎖生成物が適切な制限酵素で消化され、迅速なクローニング及び配列決定のた

めにM13ベクター中に直接連結される。特定の増幅された標的配列を有するM13溶菌斑は、標的配列に特異的なプローブと溶菌斑のリフトフィルターをハイブリダイズせしめることにより同定することができる。

本法は、伝染性疾患、遺伝子性疾患又は細胞性疾患、例えば癌、と関連する特定の核酸配列、例えば発癌遺伝子、の検出及び／又は特徴付けを可能にするために使用される。増幅は、例えば胎児細胞から得られるDNAを用いる鎌状赤血球貧血の胎児診断等、分析に利用できる核酸の量が非常に小さい場合に有用である。増幅は、本来的に感度の良くない非放射性検出技術を用いて少量の試料を分析する場合、又は放射性技術を用いるが迅速な検出が望ましい場合に特に有用である。

本発明の目的のためには、遺伝子性疾患は、例えば鎌状赤血球貧血、嚢胞性繊維症、 $\alpha$ -サラセミア、 $\beta$ -サラセミア等の、任意の生物体からのゲノムDNA中の特定の欠損及び／又は変異を含む。鎌状赤血球貧血は本法による好適なDNA配列の増幅の後のオリゴマー制限分析又はRFLP分析を経て容易に検出することができる。 $\alpha$ -サラセミアは配列が存在しないことにより検出することができ、 $\beta$ -サラセミアは疾患を起こさせる変異に近接してリンクする多形性 (polymorphic) 制限部位の存在により検出することができる。

これら全ての遺伝子性疾患は適切な配列を増幅し、それを放射性プローブを使用せずにサザンブロット法により分析して検出することができる。このような方法では、例えば非常に少量の所望配列を含む羊水からのDNAの少量の試料を増幅し、制限酵素で切断し、そしてサザンブロット法で分析する。増幅シグナルをハイレベルとすることにより、非放射性標体を使用することが容易になる。

他の態様では、少量のDNAを便利なレベルまで増幅し、次に更に伸長反応を行うが、この場合容易に検出できるヌクレオチド誘導体 (例えば $^{32}\text{P}$ 又はビオチンでラベルしたヌクレオチド三リン酸) を直接最終のDNA生成物に導入し、これを制限分析及び電気泳動分析あるいは任意の他の好適な方法を用いて分析する。この技術のモデル系の例を第5図に示してある。

第3図のモデル系に示した更に他の態様では、核酸は増幅の前に特定の制限エンドヌクレアーゼに暴露する。切断された配列は増幅できないので、予め制限酵素で処理したDNA試料の存在にもかかわらず増幅された断片が現れることは増幅された配列中にエンドヌクレアーゼの部位がないことを意味する。増幅された配列が存在するか否かは適当な方法で検出することができる。

この技術の実際的な適用方法は、本明細書とサイキらによる *Biotechnology* 3巻1008-1012頁に記載されているオリゴマー制限技術を用いて鎌状赤血球貧血の検出を容易にする使用により例示することができる。鎌状赤血球貧血は $\beta$ -グロビン遺伝子の第6コドンの1つの塩基対の変化により生ずるヘモグロビンの疾患である。第6図は多血現象 (polymorphish) 領域中の正常及び鎌状赤血球貧血の $\beta$ -グロビン遺伝子の配列を示すもので、一本線は正常遺伝子にのみ存在するDde I 部位の位置を示し、二本線は正常及び鎌状赤血球貧血対立遺伝子の両方に存在する非多形性のHinf I 部位の位置を示す。第7図は両制限部位部位間にわたり星印で示された部分がラベルされているプローブを用いて正常の $\beta$ -グロビンDNAをオリゴマー制限開裂する方法を示すものである (プローブは、制限部位からの塩基対の数が、制限部位から他の末端までの塩基対の数より少なくなる方の末端にラベルすることが好ましい)。前に記載したようにして増幅されたDNAが変性され、ラベルされたプローブとアニールされる。増幅は、2次構造の形成を最小に抑えるためにジメチルスルフォキシドの存在下温度を上げて435-40℃) 実施する。酵素Dde I はDNAを再構成されたDde I 部位で開裂させ、ラベルされたオクタマーを生じさせる。テストに使用した条件下では、オクタマーはデユプレックスから離れるのに十分な長さである。引き続き酵素Hinf I の添加は今や単鎖であるオクタマーに何の影響も与えない。第8図は $\beta$ -グロビンDNAの鎌状赤血球対立遺伝子に適用した前記と同じ方法を示す。酵素Dde I は、A-Aの塩基対がミスマッチしたものであるため、増幅されたDNAとラベルされたプローブとで形成されたデユプレックスを開裂させることはできない。しかし酵素Hinf I はハイブリッド制限開裂せしめ、ラベルされたトリマーが生成



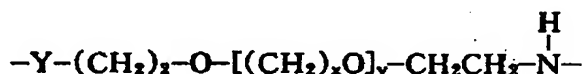
される。実際にはこの方法は、特定のシグナルが  
いずれかの対立遺伝子の存在と関連するので、個  
体のDNAが野生型ホモ接合体か、鎌状赤血球  
貧血型ホモ接合体か又は鎌状赤血球貧血形質を  
有するヘテロ接合体であるかを検診することがで  
きる。上述の方法を使用して適切な配列を増幅さ  
せることにより1つの<sup>32</sup>Pラベルのみを有するブ  
ローブを用いて単コピー遺伝子性を迅速に分析す  
ることができる。

種々の伝染性疾患は、原因となる微生物に特異  
的である特定のDNA配合の臨床試料中での存在  
により診断することができる。これらはサルモ  
ネラ、クラミジア、ネisseria等の細菌、肝炎ビ  
ールス等のビールス、マラリアの原因となるプラ  
ズモジウム (Plasmodium) 等の寄生体を含む。  
フアルコーに与えられた米国特許第4358535号は、  
伝染性疾患の診断用の特別なDNAハイブリダイ  
ゼーションプローブの使用につき記述している。  
フアルコー法に固有の問題は、感染した患者から  
の臨床試料中には比較的少ない数の病原生物しか  
存在せず、これらから抽出されたDNAは試料中\*

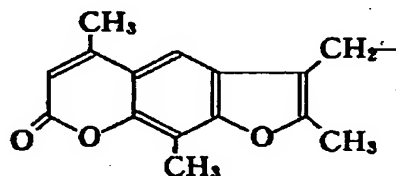
\*の全DNAの非常に小さな部分を構成するのみで  
あるということである。DNA試料を固定化しハ  
イブリダイゼーション検出する前に問題となつて  
いる配列を特異的に増幅することは、これらの方  
法の感度と特異性を大きく改良する。

伝染性疾患の診断用にDNAプローブを臨床的  
にルーチン化して使用することは、ワードのヨー  
ロッパ特許第63879号に記載されているように非放  
射的にラベルされたプローブを使用するのなら  
ば、大いに簡略化される。この方法では、ビオチ  
ンを含むDNAプローブがアビジン又はビオチン  
に特異的な抗体に結合した色素体  
(chromogenic) 酵素により検出される。この型  
の検出は便利であるが、比較的低感度である。本  
法による特異的なDNA増幅と安定にラベルされ  
たプローブを組み合わせるにより、フアルコー  
及びワードの方法をルーチン化した臨床におけ  
る有用な方法に実施するのに要求される便利さと  
感度を提供することができる。

更にプローブは、ビオチンが次式のスパーサー  
アーム



に結合したビオチン化したプローブとしてもよ  
く、ここでYは、O、NH又はN-CHO、xは  
1から4までの数、そしてyは2から4までの数  
である。そして次にスパーサーアームは次式のブ  
ソラレン成分に結合している。



ブソラレン成分は、クラージ・テツベによる  
Biocm. Biophys. Acta. 697 巻 1 - 5 頁 (1982 年)  
に記載されているように“ギャップのある環状”  
のプローブに挿入し架橋し、ここでギャップ  
のある環の単鎖ハイブリダイゼーション領域はブ  
ライマーに含まれる領域にわたる。

この増幅工程は単一コピーのヒト遺伝子から十  
分な量のDNAを調製するのに利用することもで  
き、これにより臭化エチジウムのような簡単な非

特異的なDNA染色によりそれを検出でき、直接  
DNA診断を行うことができる。

伝染性疾患及び生物体のゲノム中の病原的異常  
性を検出するほか、本法は任意の病原状態と関連  
しないDNA多形現象 (ポルモルフィズム) を検  
出するために使用することもできる。

次の実施例は例示のために提示するもので、ど  
のようにも本発明を限定することを意図するもの  
ではない。これらの実施例で全てのパーセントは  
固体の場合は重量で、液体の場合は容量であり、  
他に指定がない限り温度は摂氏温度である。

#### 実施例 1

次のヌクレオチド配列を有する25塩基対配列  
5'CCTCGGCAACGGTCACCGCTGGATGCT3'  
3'GGAGCCGTGGCAGTGGGACCTACGA5'  
(ATCCから得られるpBR322の47塩基対Fok  
I制限断片上に含まれる) を次のように調製し  
た。47塩基対断片を含むpBR322のFok I 消化物  
を供給者であるニューイングランド社の指示によ  
る条件に従ってpBR322をFok I で消化すること

により調製した。使用したプライマーは、5'd (CCTCGGCACCG) 3' と 5'd (AGCATCCAGGGTG) 3'であり、通常の技術により調製した。25mMのリン酸カリウムと10mMの塩化マグネシウム、及び100mMの塩化ナトリウムから成る緩衝液 (pH7.5) 33μℓに2433ピコモルの上述の各プライマー、24ピコモルのpBR322のFok I 消化物、22ナノモルのデオキシATP、22ナノモルのデオキシCTP、19ナノモルのデオキシGTP及び10ナノモルのTTPを加えた。

混合物を85℃で5分間加熱し、室温まで冷却した。EコリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片の5単位を加え、温度を15分間維持した。その後再度85℃で5分間加熱し、冷却した。クレノー断片の5単位を再度加え、15分間反応を行った。加熱、冷却及び反応の各ステップを更に11回繰り返した。

最後の繰り返しの後、5μℓを反応混合物から取り出した。これを85℃で3分間加熱し、室温に冷却した。125ピコモルのα-P<sup>32</sup>-デオキシシチジン三リン酸と5単位のクレノー断片を加え反応を15分間進行させた。ラベルされた生成物をポリアクリルアミドゲルの電気泳動で確認した。13サイクル後に見える強くラベルされたバンドのみが、意図する25塩基対配列であつた。

## 実施例 2

増幅されるべき所望の配列は、ヒトのβ-グロビン遺伝子に含まれかつ鎌状赤血球貧血に関するMst II 部位を含む94塩基対の配列であつた。該配列は第1図に示すヌクレオチド配列を有している。

### I プライマーの合成

次の2つのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを下記する方法を用いて調製した。

5'CACAGGGCAGTAACG3'プライマー-A、及び

5'TTTGCTTCTGACACA3'プライマー-B  
オートメーション化された合成法

ビューケージとカルサーズ法 (Tetrahedron Letters 22巻1859-1862頁 (1981年)) に従つて合成したジエチルフオスフロアミダイトを、バイオサーチSAM-1を使用して制御した多孔ガラス担体から誘導したヌクレオシドへ次々と濃縮し

た。この方法は、ジクロルメタン中でのトリクロル酢酸による脱トリチル化と活性のある水素供与体としてベンゾトリアゾールを使用する縮合、及びテトラヒドロフラン及びピリジン中での無水酢酸とジメチルアミノピリジンによるキャッピングを含んでいた。1サイクルの時間は約30分であつた。各ステップの収率は実質的に当量的であり、脱トリチル化の間に解離するジメトキシトリチルアルコールを集めた分光器による検査で決定した。

オリゴデオキシリボヌクレオシドを脱保護化し、精製する方法

固体担体をカラムから取り出し、1mlの濃水酸化アンモニウムに閉鎖管中室温で4時間曝した。担体を濾過で取り除き、一部が保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチドを含む溶液の温度を55℃に上昇させ、5時間維持した。アンモニアを取り除き、残渣を調製用ポリアクリルアミドゲルに適用した。30ボルト/cmで90分間電気泳動を行い、生成物を含むバンドを蛍光プレート上のUVシャドウイングで同定した。該バンドを切り取り、1mlの蒸留水で一晩かけて4℃で溶出した。この溶液をアルテックPR18カラムにかけ、pH6.0の1%酢酸アンモニウム緩衝液中7-13%のアセトニトリルで溶出した。この溶出液は260nmの紫外吸収でモニターし、適切なフラクションを集め、固定した量での紫外吸収で定量分析し、かつ室温下で減圧遠心機中で蒸発させ乾燥した。

オリゴデオキシリボヌクレオチドの特徴付け

精製したオリゴヌクレオチドのテスト溶液をポリヌクレオチドキナーゼ及びγ<sup>32</sup>P-ATPで<sup>32</sup>Pラベルした。このラベルした化合物を50ボルト/cmで45分間電気泳動にかけた後、14-20%のポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラフィーで確認した。この方法では分子量を確認することができ、ヘビ毒ジエステラーゼと細菌性アルカリフォスターゼを使用してオリゴデオキシリボヌクレオチドをヌクレオシドに消化し、そして次に、逆相HPLCカラム、並びに10%アクリロニトリル及び1%酢酸アンモニウム移動相を使用して、誘導されたヌクレオシドを分離し定量することにより塩基組成を決定した。

### II DNA源

A 全ヒト野性型DNAの抽出

正常の $\beta$ -グロビンのヒトゲノムDNAホモ接合体を、ステットラーらによりProc.Nat.Acad.Sci.の72巻5966-5970頁に記載された技術を用いてセルラインMolt4(ヒューマン・ジエネティク・ミュータント・セル・レポジトリから入手し、CM2219cと同定した)から抽出した。

#### B クローン化したグロビン遺伝子の造成

正常の $\beta$ -グロビン遺伝子の1.9kbのBamHI断片をコスミドpFC11から分離し、pBA322のBamHI部位に挿入した(ソベロンらのGene 9巻287-305頁(1980年))。合成40塩基対プローブとハイブリダイズする領域を含むこの断片は、第1及び第2のエクソン、第2のイントロン、並びに遺伝子の5'のフランキング(flancking)配列を含む(ローンらのCell 15巻1157-1174頁)。このクローンはpBR328:HbAと名付けられ、ATCC第39698号として1984年5月25日に寄託された。

$\beta$ -グロビンの鎌状赤血球貧血対立遺伝子の対応する1.9kbのBamHI断片はコスミドpF12から分離され、上述の通りクローン化された。このクローンはpBR328:Hbsと名付けられ、ATCC第39699号として1984年5月25日に寄託された。

各組み換えプラスミドをEコリー-MM294(ATCC第39607号)へ形質変換し、そして増殖せしめた。

#### C クローン化されたグロビン遺伝子のMst IIによる消化

それぞれの全量が100 $\mu$ gであるpBR328:HbAとpBR328:Hbsを単独で20単位のMst II(ニューイングランドバイオラブ社)とともに16時間37 $^{\circ}$ C、150mM NaCl、12mMのTris HCl(pH 7.5)、12mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのジチオスレイトール(DTT)及び100 $\mu$ g/mlのウシ血清アルブミン(BSA)中で消化した。生成物はそれぞれpBR328:HbA/Mst II及びpBR328:Hbs/Mst IIと名付ける。

5'(TCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAG) 3'

の<sup>32</sup>Pでラベルされた40塩基対の合成断片で検知した。第2図は、反応I及びII用の検知されたナイロン膜のオートラジオグラフである。レーン1は0.1ピコモルの58塩基対の対照合成断片で、そのうちの1つの鎖は上記プローブと相補的である。レーン2は第1の増幅サイクルの前の4 $\mu$ l

#### \*III ポリメラーゼの連鎖反応

60mM酢酸ナトリウム、30mMトリスアセテート及び10mM酢酸マグネシウムを含むpH8.0の緩衝液100 $\mu$ lへ100ピコモルのプライマーA(d(CACAGGGCACTAACG)の配列)、100ピコモルのプライマーB(d(TTTGCTTCTGACACA)の配列)及び1000ピコモルのデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPを含む2 $\mu$ lの溶液を加えた。更に上述した、下記のDNA源の1つを加えた。

10 $\mu$ gの全ヒト野性型DNA(反応I)

0.1ピコモルのpBR328:HbA(反応II)

0.1ピコモルのpBR328:Hbs(反応III)

0.1ピコモルのpBR328:HbA/Mst II((反応IV)

0.1ピコモルのpBR328:HbB/Mst II(反応V)

非標的DNA(反応VI)

得られる各溶液を100 $^{\circ}$ Cで4分間加熱し2分間で室温まで冷却し、その後Eコリー-DNAポリメラーゼのクレノー断片の4単位を含む1 $\mu$ lを加えた。各反応は10分間行い、その後プライマー、ヌクレオチド及びDNAを加え、加熱し、冷却し、ポリメラーゼを加え、そして反応させるサイクルを反応Iについては19回、反応II-VIについては4回繰り返した。

第1サイクルの前及び各反応の最後のサイクルの後で取り出された反応I及びIIのアリコート4マイクロリットルを、pH8.3の0.089Mトリス酢酸塩緩衝液中で、2.5mMEDTA中で、12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルを25ボルト/cm、4時間電気泳動させ、固相担体として機能するナイロン膜へ移し、そして、pH7.4で30%のフォルムアミド、3xSSPE、5xデンハルツ及び5%のドデシル硫酸ナトリウム中で、標準的技術を用いて調製した次式:

の反応Iの液である。レーン3は20回の増幅サイクル後の4 $\mu$ lの反応Iの液である。レーン4は5回の増幅サイクル後の4 $\mu$ lの反応IIの液である。レーン5は $\alpha$ -<sup>32</sup>P-デオキシNTP及びポリメラーゼでラベルされたpBR322(ニューイングランドバイオラブ社)のFok I((ニューイング

ランドバイオラブ社) から成る分子量標準である。レーン 3 は、20 サイクル後反応混合物 I は適切な分子量を有する特定の配列を大量に含み、他の検出できる生成物がないことを示している。5 サイクル後の反応混合物 II もレーン 4 に示す通り

出発物質である核酸と他の生成物の他にこの生成物も含んでいる。  
5 サイクル後の反応 II から VI の液 5.0  $\mu\ell$  に上述の各プライマー 5 ピコモルを加えた。溶液を 4 分間 100°C に加熱し室温へ戻した。それぞれ 3 ピコモルの  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-デオキシ ATP、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-デオキシ CTP、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-デオキシ GTP 及び  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-TTP、並びに 4 単位のクレノー断片を加えた。最終的な容積が 10  $\mu\ell$  であり塩濃度が上した通りである反応を 10 分間行わせた。ポリメラーゼ活性は 60°C で 20 分間加熱すると失われた。反応 II-VI の反応液 4  $\mu\ell$  を、0.089 M トリス硼酸塩緩衝液、2.5 mM EDTA 中で 12% ポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルを 25 ボルト/cm、4 時間電気泳動させ、その後オートラジオグラフ処理した。

第 3 図は、電気泳動のオートラジオグラフである。レーン 1 は分子量標準、レーン 2 は反応 II、レーン 3 は反応 III、レーン 4 は反応 IV 及びレーン 5 は反応 V である。対照としての DNA を伴わない反応 VI のレーンはレーンのどこにもイメージを有さない。図から、標的 DNA から予想される 94 塩基対断片は、無傷の  $\beta$ -グロブリン DNA 配列が増幅用に使用できるときのみ存在できることが分かる (つまりレーン 2 の pBR328 : HbA、レーン 3 の pBR328 : HbS 及びレーン 5 の pBR328 : HbS / Mst II)。Mst II による消化は pBR328 : HbA を 94 塩基対配列中で切断し、それを増幅できないようにし、94 塩基対のバンドはレーン 4 に現れない。これに対し、pBR328 : HbS の 94 塩基対配列はプラスミドが Mst II で消化されても切断せず、従って第 5 図に示すように増幅に利用できる。

第 4 図は 94 塩基対配列を増幅する 3 サイクルの連鎖反応を示すものである。PCO 1 と PCO 2 はプライマー A 及び B である。右の数はサイクルを示し、左の数は特定の分子が生産されたサイクル数を示す。

#### 実施例 3

本実施例は、ヒトヘモグロビン遺伝子中の対立

遺伝子 Mst II 部位を含む 110 塩基対配列の増幅を示すものである。

プライマーは実施例 2 の技術で調製されたものである。1.0 マイクログラムの全ヒト DNA、100 ピコモルの d (ACACA ACTGTGTTCACTAGC) 及び 100 ピコモルの d (CAACTTCATCCACGTTCCACC) を以下のような 100  $\mu\ell$  の溶液に溶解させた。

1.5 mM 各 4 つのデオキシリボヌクレオシド三リン酸

30 mM pH 7.9 のトリスアセテート緩衝液

60 mM 酢酸ナトリウム

10 mM 酢酸マグネシウム

25 mM ジチオスレイトール

この溶液を 100°C で 1 分間加熱し、迅速に 25°C に下げて 1 分間加熱し、その後 DNA ポリメラーゼのクレノー断片 2.5 単位を加えた。ポリメラーゼの反応が 25°C で 2 分間行い、その後加熱、冷却、クレノー断片の添加及び反応を望むだけ繰り返した。

各サイクルの効率が 70°C で、15 サイクル行つて、 $\beta$ -グロビン遺伝子の所望の 110 塩基対断片 1.4 フェトモルを合成した。

#### 実施例 4

本実施例は、ヒトヘモグロビン遺伝子の対立遺伝子中の Mst II 部位を含む 240 塩基対配列の増幅を示すものである。この配列は、Nco I、Hinf I 及び Mst II 制限部位を含んでいる。

pH が 8.0 で、60 mM 酢酸ナトリウム、30 mM トリスアセテート及び 10 mM 酢酸マグネシウムの混合物 (0.1 ピコモルの pBR328 : HbA を含む) に、

100 ピコモルの d (GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) プライマー、

100 ピコモルの d (TAACCTTGATACCAACCTGCCC) プライマー、

各 1000 ピコモルのデオキシ ATP、デオキシ CTP、デオキシ GTP 及び TTP

を含む 2  $\mu\ell$  の溶液 A を加えた。

2 つのプライマーは実施例 2 に記載した技術で調製した。溶液を 100°C で 4 分間加熱し、空気中で 2 分間冷却し、その後 E コーリー DNA ポリメラーゼのクレノー断片 4 単位を含む液 1  $\mu\ell$  を加

えた。反応を10分間進行させ、その後溶液Aの添加、加熱、冷却、ポリメラーゼの添加及び反応からなるサイクルを3回繰り返した。反応液5.0 $\mu$ lに、上記の各オリゴヌクレオチドプライマー5ピコモルを加えた。溶液を100℃で4分間加熱し、室温まで下げ、その後それぞれ3ピコモルの $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ラベルされたデオキシリボヌクレオシド三リン酸及び4単位のクレノー断片を加えた。最終的な容量が10 $\mu$ lで塩濃度が上記の通りである反応を10分間進行させる。ポリメラーゼ活性は60℃で20分間加熱すると失活した。2 $\mu$ lのアリコートにNco I、Hinf I及びMst IIで消化し、pH8.3の0.089M トリスアセテート緩衝液、0.25mMEDTA中で12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。ゲルを25ボルト/cmで4時間電気泳動させ、オートラジオグラフ処理した。第5図は電気泳動のオートラジオグラフを示し、ここでレーン1は分子量標準、レーン2は酵素の消化を伴わないもの(無傷の240塩基対)、レーン3はNco Iによる消化(131及び109塩基対)、レーン4はMst IIによる消化(149及び91塩基対)、そしてレーン5はHinf Iによる消化(144及び96塩基対)である。オートラジオグラフは240塩基対反応の増幅したものと一致する。

#### 実施例 5

本実施例は、逐次的消化による鎌状赤血球貧血を検出するための本発明の方法の使用を示すものである。

オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及びリン酸化

5\*

CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA  
CTGCCCTGTGGG3'

の配列のラベルされたDNAプローブ(\*がラベルを意味する)RS06、及びRS06と3つの塩基対がミスマッチしている。

3'GACAGAGGTCACCTCTTCAGACGGCAA  
TGACGGGACACCC5'

の配列のラベルされていないブロックオリゴマーRS10を、実施例2(I)の方法に従って合成した。プローブRS06は、その5ピコモルを、70mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1.5mM スペルミン及び2.5mM ジチオスレイトー

ルを含む反応容量40 $\mu$ l中の4単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニューイングランドバイオラプ社)及び50ピコモルの $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP(ニューイングランドニュークレア社、約7200Ci/ミリモル)と接触させることによりラベルした。全容量を25mMEDTAで100 $\mu$ lに調節し、トリス-EDTA(TE)緩衝液(10mM トリス緩衝液、0.1mMEDTA、pH8.0)により平衡化されたバイオラッド製の1mlのBio Gel P-4 スピン透析カラム上でマニアティスらがMolecular Cloning 464-465頁(1982年)に記載している方法に従って精製した。ラベルされたプローブは、トリス-硼酸-EDTA(TBE)緩衝液(89mM トリス、89mM 硼酸、2.5mMEDTA、pH8.3)中18%のポリアクリルアミドゲル(19:1のアクリルアミド:BISとバイオラッド)上で500vhrにて電気泳動してさらに精製した。オートラジオグラフによる位置きめの後、ラベルされたプローブを含む部分を切り取り、粉碎し、0.2mlのTE緩衝液中へ一晩かけて4℃で溶出させた。反応生成物のTCA沈殿は比活性が4.9Ci/ミリモルであり、最終的な濃度が20ピコモル/mlであることを示している。

ラベルされないRS10プロツキングオリゴマーは200ピコモル/mlの濃度で使用した。

#### 25 細胞系からのヒトゲノムDNAの分離

実質的にステットラーらのPNAS79巻5966-5970頁(1982年、Molt4について)に記載の方法及びマニアティスらのMolecular Cloning280-281頁(1982年)に記載の方法を使用して、Molt4、SC-1及びGM2064のリンパ球系から高分子のゲノムDNAを分離した。

Molt4(ヒューマン・ミュータント・セル・デポジトリ、GM2219C)は正常の $\beta$ -グロビンについてホモ接合体のT細胞系であり、そしてATCCに1985年3月19日に寄託されたSC-1は鎌状赤血球貧血対立遺伝子についてホモ接合体のEBVで形質変換されたB細胞系である。GM2064(ヒューマン・ミュータント・セル・デポジトリ、GM2064)は胎児ヘモグロビンの遺伝的な永続性(HPFH)についてホモ接合体である個体から最初単離され、 $\beta$ -又は $\delta$ -グロビン遺伝子配列を含んでいない。全ての細胞系は10%の牛胎児血清を含むRPMI-1640中に維持された。

## 臨床血液試料からのヒトゲノムDNAの単離

既知の鎌状細胞キャリアー (AS) からのCH12と名付けられた臨床血液試料をカルフォルニア州オークランドの小児病院のベルトラム・ルビン博士から得た。ヌンベルグらのProc.Nat.Acad.Sci. 75巻5553-5556頁 (1978年) に記載されている方法の変法を使用して、主に末梢の血液リンパ球から成るパフィーコート部分からゲノムDNAを調製した。

細胞を、5 mlのトリス-EDTA-NaCl (TEN) 緩衝液 (pH 8 の 10mM トリス、pH 8、1mMEDTA、10mMNaCl) 中に再懸濁し、0.2 mg/mlのプロテイナーゼ、0.5%のSDSに調節し、そして37℃で一晩インキュベートした。過塩素酸ナトリウムを0.7Mに加え、そして細胞溶解物を室温で1-2時間穏やかに振とうした。細胞溶解物をフェノールとクロロフォルムの1:1混合物30mlで抽出し、続いてクロロフォルム30mlで抽出し、次にエタノールで核酸を沈殿させた。ペレットを2 mlのTE緩衝液に再懸濁させ、RNaseを0.005 mg/mlに加えた。37℃で1時間消化させた後、DNAを同量のフェノール、フェノール/クロロフォルム、及びクロロフォルムでそれぞれ一度ずつ抽出し、エタノールで沈殿させた。DNAを0.5mlのTE緩衝液に再懸濁させ、260nmの吸収により濃度を決定した。

β-グロビン配列を選択的に増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応

2 マイクログラムのゲノムDNAを、10mM トリス 緩 衝 剤 (pH 7.5)、50mMNaCl、10mMMgCl<sub>2</sub>、150ピコモルの配列 d(CACAGGGCACTAACG) のプライマーA、及び配列 d(CTTTGCTTCTGACACA) のプライマーBを含む反応容量100μlの当初溶液中で増幅し、かつ蒸発を防ぐため約100μl厚の鉱油で被覆した。

各DNA試料につき、1サイクルが次の3ステップから成る増幅のための15サイクルを行つた。

- (1) 2分間95℃で熱ブロックセット中で変性する。
- (2) 熱ブロックセットを直ちに30℃に移し2分間プライマーとゲノムDNAがアニーリングするようにする。

- (3) E. コーリー-DNAポリメラーゼ I のクレノー断片 (ニューイングランドバイオラブ) 5単位とデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPそれぞれ1ナノモルを含む2μlの溶液 (10mMトリス (pH7.5)、50mMNaCl、10mMMgCl<sub>2</sub>、及び4mMジチオスレイトールから成る緩衝液中) を加える。この伸長反応を30℃にて10分間行つた。

最後のサイクルの後、95℃に2分間維持して反応を停止させた。鉱油は0.2mlのクロロフォルムで抽出して廃棄した。最後の反応液の容量は130μlであつた。

プローブ及びDde I/Hinf Iによる増幅したゲノムDNAのハイブリダイゼーション/消化

- 25 マイクロリットルの増幅されたゲノムDNAをエタノールで沈殿させ、同量のTE緩衝液中に再懸濁した。10マイクロリットル (154ngのゲノムDNAと同等の前増幅体を含む) を1.5mlのマイクロフュージ管に入れ、そして20μlのTE緩衝液により最後の容量を30μlとした。試料を鉱油で被覆して95℃で10分間変性した。ラベルされたRS06プローブ0.02ピコモルを含む0.6MNaCl10マイクロリットルを管に加え、穏やかに混合し、直ちに56℃の熱ブロックに移して1時間おいた。ラベルしていないRS10プロセッシングオリゴマー4マイクロリットル (0.8ピコモル) を加え、更に10分間同じ温度でハイブリダイゼーションを続けた。5 マイクロリットルの60mMMgCl<sub>2</sub>/0.1% BSA及び1μlのDel I (10単位、ニューイングランドバイオラブ) を加え、再アニーリングされたDNAを56℃で30分間消化した。1 マイクロリットルのHinf I (10単位、ニューイングランドバイオラブ) を加え、更に30分インキュベートした。4μlの75mMEDTAと6μlのトラッキング染料を最終容積が61μlになるように反応混合物に加えて反応を終了した。

鉱油を0.2mlのクロロフォルムで抽出し、18μlの反応混合物 (45nmのゲノムDNA) をヘーフア-SE200装置中の30%ポリアクリルアミドのミニゲル (19:1、バイオラド) に負荷した。このゲルをプロモフェノールブルー染料の前端が当初の位置から3.0cm動くまで約300ボルトで1時間電気泳動させた。該ゲルの前端の1.5cmは取り除かれ、残残りのゲルは4日間-70℃で強化スクリーンに



曝される。

#### 写真の検討 (第9図)

各レーンには45ngの増幅されたゲノムDNAを含んでいる。レーンAはMolt4DNAを、レーンBはCH12を、レーンCはSC-1を、又レーンDはGM2064を含んでいる。Molt4は、細胞当たり2コピーの $\beta^A$ 遺伝子を有する正常の個体の遺伝子型CAAであり、CH12は、細胞当たり1個の $\beta^A$ と1個の $\beta^S$ 遺伝子を有する鎌状細胞キャリアからの臨床用試料(AS)であり、そしてSC-1は細胞当たり2コピーの $\beta^S$ を有する鎌状血球血貧血個体の遺伝子型を意味する。CM2064は $\beta^-$ 又は $\delta^-$ グロビン配列を含有せず、ネガティブ対照として存在する。

写真から分かるようにDde Iで開裂された、 $\beta^A$ 特異的であるオクタマーは $\beta^A$ 遺伝子を含むDNAにのみ存在し(レーンA及びB)、Hinf Iで開裂された、 $\beta^S$ 特異性を有するトリマーは、 $\beta^S$ 遺伝子を含むDNAにのみ存在する(レーンB及びC)。トリマー及びオクタマーの両者の存在(レーンB)は鎌状赤血球貧血キャリアを示すものであり、オクタマーのみを生ずる正常の個体(レーンA)及びトリマーのみを示す鎌状赤血球貧血にかかっている個体(レーンC)から区別される。

比較のため、上記実験を増幅されていないゲノムDNAを用いて繰り返し行い、増幅を行うと検出感度が少なくとも1000倍増加することが分かった。

#### 実施例 6

本実施例は、ラベルされたプローブを使用することなく全ヒトDNA中の全く精製されていない単一コピー遺伝子をゲル上で直接検出する方法を示すものである。

実施例3に記載した技術を用い、 $\beta$ -グロブリン遺伝子の第1エクソン中の配列からの110塩基対断片を、全ヒトDNA10マイクログラムから20サイクルで増幅した。この20サイクル後に生産される110塩基対断片は、臭化エチジウムにより容易に染色されてゲル上で見ることができる。

配列は、最初に制限酵素Dde Iにより切断されると、配列が $\beta$ -グロビンのS対立遺伝子中における場合のように酵素により認識される制限部位を含まないものでない限り、増幅されなかった。

#### 実施例 7

A ヒト $\beta$ -グロビンA対立遺伝子からの1.9kb挿入部を含有する合計100フェムトモルのpBR328、500Ci/モルである各 $\alpha$ - $^{32}$ P-デオキシNTPを50ナノモルずつ、及び実施例3で使用した各プライマー1ナノモルを、100 $\mu$ lの30mMトリス-アセテート(pH7.9)、60mM酢酸ナトリウム、100mMジチオスレイトール及び10mM酢酸マグネシウムを含む溶液中に溶かした。この溶液を100℃にして2分加熱し、25℃にて1分冷却した。4.5単位のEコリーDNAポリメラーゼI及び0.09単位の無機ピロフオスファターゼを加えて反応混合物中でピロリン酸が生ずるのを防止し、その後反応を25℃で2分間進行させ、更に加熱、冷却、酵素の添加及び反応のサイクルを9回繰り返した。各合成サイクルの後、10 $\mu$ lのアリコートを取り出し1 $\mu$ lの600mMEDTAに加えた。それぞれを、90mMのトリスポレート及び25mMEDTA中、pH8.3で14%のポリアクリルアミドゲル上で24ボルト/cm、2.5時間で分析した。操作の終了したゲルは、0.5 $\mu$ g/mlの臭化エチジウムを加えた同じ緩衝液に20分浸し、当初の緩衝液で洗浄し、赤フィルターを用いて紫外線中で写真を撮影した。

生産された110塩基対断片は紫外線でゲルから切り出し、そしてクレンコフ放射により計数した。Nがサイクル数を意味し、yがサイクル毎の部分的収率である式

$$\text{pmoles}/10\mu\text{l} = 0.01((1+y)^N - yN - 1)$$
にデータを一致させようとする試みは、yが0.619であときに楽観的なものとなる。これは、十分な増幅が起こっていることを暗示している。

B 各デオキシNTPを100ナノモルずつ100 $\mu$ lの反応溶液に加え、放射性ラベルを行わず、各サイクル毎に液を取り出さなかつた以外は、上記実験を繰り返した。10サイクル後に反応物を2分間沸騰させて反応を停止させ、57℃、1時間で再ハイブリダイゼーションを行った。110塩基対生成物の配列を、その8 $\mu$ lのアリコートを、1 $\mu$ lの血清アルブミン(25mg/ml)と1 $\mu$ lの好適な制限酵素((Hinf I、Mnl I、Mst II、Nco I)を加えて制限分析し、37℃で15時間反応させて確認した。DAGEは、上述の通

り行つた。

#### 実施例 8

本実施例は、pBR328とpBR322の種々の断片を増幅するために異なつたプライマーを使用する\*

(TTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC) 及び

d(GCCTCACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC)

B 次のプライマーを用いたこと以外は実施例7Aと同じように実験を繰り返しpBR328の262塩基対断片を調製した。反応時間はサイクル当たり20分であつた。

d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) 及び

d(TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG)

C ヒトβ-グロビンS対立遺伝子からの1.9kbの挿入部を含む100フェムトモルのpBR328のMst II 消化物を当初の鋳型として用いた以外は、実施例8Bと同様に実験を行つた。該プラスミドはMst IIにより数回切断されたが、増幅すべき配列の内側では切断が起こらなかつた。更に、使用したプライマーは次の通りで、240塩基対断片を生産した。

d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) 及び

d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC)

D 100フェムトモルのpBR322のNru I 消化物を鋳型として用い、100μℓの反応液中で各デオキシNTPを200ナノモル使用し、次のプライマーを使用してpBR322から500塩基対断片を生産した以外は実施例7Bと同様に実験を行つた。

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) 及び

d(CTTCCCCATCGGTGATGTGG)

反応時間は37℃でサイクル当たり20分であつた。最後の再ハイブリダイゼーションは57℃で15×35

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

これらのプライマーは101塩基対を生産するように設計され、その(2番目のプライマー中の)26ヌクレオチドはpBR322には存在しない。これらのヌクレオチドはT7プロモーターの配列を表すもので、これを、pBR322からの75塩基対配列に、20の相補的塩基と26塩基の5'側伸長部とを有するプライマーを使用して連結した。この方法は

例を示す。

A 次のプライマーを使いpBR328の130塩基対断片を調製すること以外は実施例7Aと同じように実験を繰り返した。

※時間行つた。電気泳動は4%アガロースゲル上で行つた。

#### 実施例 9

本実施例は、インビトロ変異が増幅されたセグメントに導入されるような本発明方法を例示するものである。

15 A Nru Iで直線化したpBR322合計100フェムトモル、1ナノモルの75塩基対断片を生成するように設計されたそれぞれ次式

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) 及び

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT)

20 のプライマー、それぞれ100ナノモルの各デオキシNTPを、pH 8の40mM トリス、20mM MgCl<sub>2</sub>、5mMジチオスレイトール及び5mg/mlのウシ血清アルブミンの溶液100μℓ中で混合した。この混合物を100℃にして1分間加熱し、水浴中23℃、0.5分間冷却し、次に4.5単位のクレノー断片と0.09単位の無機ピロフオスファターゼを加え、反応を3分間行つた。加熱、冷却、酵素添加及び反応のサイクルを9回繰り返した。10回目の反応サイクルは凍結により終了させ、反応混合物のアリコート8μℓを4%アガロースゲルに適用し、臭化エチジウムにより覚化した。

25 B オリゴヌクレオチドプライマーとして次式のものを使用した以外は実施例9Aと同様の実験を繰り返した。

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) 及び

2時間より少ない時間で実施することができ、100フェムトモルのpBR322から比較的純粋な101塩基対断片2ピコモルを生産することができた。

T7プロモーターはRNA転写を開始させるために使用できる。T7ポリメラーゼを101塩基対断片に加えて単鎖RNAを生成せしめることができる。

C オリゴヌクレオチドプライマーとして下記の

ものを使用して、pBR322から1000塩基対断片を調製した以外は実施例8Dと同様に実験を繰り返した。

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) 及び  
d(CCAGCAAGACGTAGCCCAGC) \* 5

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

を使用して1026対断片を調製した。2番目のプライマーの26ヌクレオチドはpBR322には存在せず、上記のT7プロモーターを示すものである。このプロモーターは、pBR322からの1000塩基対断片に隣接して挿入された。

これらの結果は、鋳型鎖と完全にマッチしていないがそれにもかかわらず十分にハイブリダイズして酵素的に伸長するプライマーは、当初の鋳型に対応する鎖よりむしろプライマーの鎖を含む長鎖生成物を生成せしめるということを暗示する。長鎖生成物はインビトロ変異を生じさせる第2のプライマー用の鋳型としての役割を果たす。その後のサイクルでは、更に多くのミスペアしたプライミングが要求されないの、効率が減少することなくこの変異は増幅される。この場合、その5'末端に相補的でない伸長部分があるプライマーが、複製されるべき鋳型に隣接して生成物中に新しい配列を挿入するために使用された。

#### 実施例 10

本実施例は単コピー遺伝子を増幅させる際にパ\*

d(CAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTG) 及び

d(CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCC)

これらは、上記で生産された110塩基対断片中に含まれる58塩基対断片を増幅した。増幅すべき最後の10回のサイクルは、10 $\mu$ lのアリコート、上記した各デオキシNTP100ナノモルと各プライマー200ピコモルを含む90 $\mu$ lの新しいトリス-アセテート緩衝液に希釈することにより達成することができた。反応条件は上記の通りとした。10サイクルの後10 $\mu$ lのアリコート（当初のDNAの100ナノグラムに対応）を6%のNuシーブ（FMC社）アガロースゲルに加え、臭化エチジウムを使つて視覚化した。

第10図は、紫外線で発光させた従来法の通り赤いフィルターを通して写真撮影した上記ゲル

\*D 上記9cと同様の実験を繰り返した。但し、オリゴヌクレオチドプライマーとして下記のもの、

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) 及び

\*ツクグラウンドを減少させるためにネスト状に（nested）セットしたプライマーを使用すること、を例示するものである。

野性型 $\beta$ -グロビン対立遺伝子についてホモ接合体である全ヒトDNAに対して、20サイクルの増幅を次のように行つた。10 $\mu$ gのDNA、それぞれ200ピコモルの次式のプライマー、

d(ACACAACCTGTGTTCACTAGC) 及び  
d(CAACTTCATCCACGTTCACC)

並びに100ナノモルずつのdNTPを、100 $\mu$ lの30mMトリス-アセテート、60mM酢酸ナトリウム、10mMジチオスレイトール、及び10mM酢酸マグネシウム中で100 $^{\circ}$ Cにて1分間加熱し、25 $^{\circ}$ Cに1分間下げて、そして2単位のクレノー断片とともに2分間処理した。加熱、冷却、クレノー試薬の添加のサイクルを19回繰り返した。10 $\mu$ lの液体を反応混合物から取り出し、更に10回の増幅のためのサイクルを次の各プライマーを用いて行つた。

を示すものである。レーン1は分子量のマーカーである。レーン2は上記反応のアリコートである。レーン3は当初の野性型DNAが増幅の前にDde Iにより開裂されたこと以外は上記記したものと同一反応のアリコートである。レーン4は鎌状赤血球貧血 $\beta$ -グロビン対立遺伝子についてホモ接合体であるヒトDNAを増幅の前にDde Iで処理したこと以外は上記と同様な反応のアリコートである（鎌状赤血球貧血対立遺伝子は増幅される断片内にDde I部位を含まない）。レーン5は鮭の精子DNAでヒトDNAを置き換えた以外は上記と同様の反応のアリコートである。レーン6は増幅後反応液をDde Iで処理したこと以外は上記

と同様な反応のアリコートである (Dde I は58塩基対の野性型生成物を27塩基対及び34塩基対の断片に変換する)。レーン7は増幅後Dde I で処理したレーン4の材料のアリコートである (58塩基対の鎌状赤血球貧血生成物はDde I を含まない)。

アガラーセゲルの臭化エテジウム染色のみを使用してヒトDNAの1マイクログラムからの単コピー遺伝子を代表する58塩基対断片を検出するためには、約500000倍に増幅することが必要である。これは、ここで2つのオリゴヌクレオチドのネスト状セットを使用して達成することができる。第1のセットは110塩基対断片を増幅し、そして内部のネスト状セットは、第10図に示すように便利に検出できるレベルになるまでこの生成物のサブ断片を増幅する。先行する増幅工程で増幅された配列中に含まれ、又他のプライマーの伸長生成物中にも含まれるより小さな配列をプライマーを使つて増幅する本法は、例えばコナーらのPNAS80巻278頁 (1983年) 及びレアリーらのPNAS80巻4045頁 (1983年) に記載されているように放射性同位体又は非放射性同位体プローブのハイブリダイゼーションの方法論に頼ることなく、 $\beta$ -グロビンの座における野性型を鎌状赤血球貧血対立遺伝子から区別することを可能にする。

#### 実施例 11

本法は、患者のDNA試料中の例えばクラミジアのような伝染性疾患と関連する特定の配列を、所望の増幅された配列を含むビオチン化されたハイブリダイゼーションプローブを使用しかつ前述の米国特許第4358535号に記載された方法を使用して検出する際に有用であることが期待される。ビオチン化されたハイブリダイゼーションプローブは、一部が二重鎖となつたDNAに、次式のスベサーアームを介してビオチンに結合した4'-メチレン置換-4, 5'-8-トリメチルブソレンを挿入しかつ光を照射することにより調製することができる。



式中Yは、O, NH又はN-CHO、xは1から4までの数、そしてyは2から4までの数である。プローブ上のビオチニル基の検出には、エンゾバイオケム社により市販されているストレプトビジニン-酸性ホスファターゼ複合体を用いて、パンフレットに製造者が示している検出方法により達成することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、検出用複合体との結合、及びそれに続く酸性ホスファターゼにより触媒される反応 (この反応が沈澱性色素を生成する) に基づく沈澱した染色スポットとして見る事ができる。

#### 実施例 12

本実施例では、実施例7の方法を基本的には使用し、ヒト $\beta$ -グロビン遺伝子上の119塩基対断片を次のプライマーを使用して増幅させた。

5' —  
CTTCTGcagCAACTGTGTTCACTAGC  
—3'(GH18)

5' —CACaAgCTTCATCCACGTTTCACC  
—3'(GH19)

ここで小文字は野性型配列とミスマッチし、制限酵素部位を生成する。全スキームは表1に示してある。表1はヒト $\beta$ -グロビン遺伝子の119塩基対断片をクローン化しかつ配列決定するために使用され、又内部制限部位を含むよう設計されているプライマーGH18及びGH19を図解したものである。出発コドンATGにはアンダーラインが引かれている。GH18は、負鎖と相補的な26塩基対のオリゴヌクレオチドでかつ内部にPst I 部位を有している。GH19は正鎖に相補的である23塩基対のオリゴヌクレオチドであり、内部にHind III 認識部位を含んでいる。矢印は、DNAポリメラーゼ I による伸長方向を示す。四角で囲った配列は各プライマーの制限酵素認識配列を示す。これらのプライマーは、バクテリオファージM113のPst I とHind III 制限部位に対して相同である遺伝子領域を第1にスクリーニングして選択された。次に、プライマーは先行する実施例で記載した通りに調製された。

# TABLE I

**CH19**

**Del** .....

CCACTTCGA	CAC
CTAC	TTCgAa

CTTCTGACAGACTGTGTTCTACCAAGCTCAACAGACACCAAGCTGCACTCTGTCAGGACAGAGTCTGCGCTTACTGCGCTGTGGCGAAGCTCAAGCTGATCGAGTTGGTG( + )

GAAGACTGTGTTGACACAAGTGAATGTTTCAGATTGTTGTGTGTACCAAGCTGGAGCTGACGACTCTCTTCAGAGCGCAATGACGGGACACCGCGTTTCACTTTCGACTTCAACCCAC( - )

CTTCTG cagCAA CTGTGTTCACTAGC →

GH18

**Pst 1**

5' CTTCCTG cagCAA CTGTGTTCACTAGC 3' GH18 左リンカープライマー

5' CAG aAgCTT CATCCAGGTCACG 3' GH19 右リンカープライマー

### Hind III

## 増幅及びクローニング

実施例2で述べたように細胞系Molt4から単離した1マイクログラムのヒトゲノムDNAの増幅を20サイクル行つた後、反応生成物の14分の1を、ラベルした $\beta$ -グロビンに特異的であり、その配列が、5'-CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTACTGCCCTGTGGG-3'であるオリゴヌクレオチドプローブRS06に上述のオリゴマー制限法を用いてハイブリダイズさせた。溶液ハイブリダイゼーションの後、反応混合物を上記した制限消化条件下でDde Iにより処理して8塩基対オリゴヌクレオチドを生成せしめた。この8塩基対の生成物の量は、増幅され生成された生成物の量に比例する。この消化生成物は30%のポリアクリルアミドゲル上で分離し、オートラジオグラフィーで視覚化した。

オートラジオグラムを分析した結果、該増幅は野生型 $\beta$ -グロビン遺伝子の正鎖及び負鎖のそれぞれと相補的であるプライマーPC03(5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3')及びPC04(5'-CCACTTGCACCTACTTCAAC-3')による増幅と増幅効率において匹敵するものであることが分かった。

増幅された生成物はエタノールで沈澱して脱塩しそして濃縮し、そしてサンプルを10mM トリス、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、100mM NaClから成る制限緩衝液(pH 8)に再溶解し、Pst I及びHind IIIで同時に消化した。その消化後、試料をセントリコン10濃縮装置で脱塩し、ベアリンガー・マンハイム社から入手できるPst I/Hind IIIで消化されたベクターM13mpl0wの0.3マイクログラムと、12°Cで一晩連結した。

全部の結合混合物がメリーランド州ベテスダのBRLから入手できるEコーリー株JM103へ形質転換された。形質転換株を調製するための方法は、A.ワルトンによりMessing, J. Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA 143-153頁に記載されている。

形質転換混合物を、ナイロンフィルターを用いるブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングのため、x-ゲル培地上に移した。フィルターを、 $\beta$ -グロビンに特異的な、配列が5'-

CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCC TCAGGAGTCAG-3'であるオリゴヌクレオチドプローブRS24により検知して、 $\beta$ -グロビン挿入部の数を決定した。フィルターはプライマーPC04で再度標識され、全挿入数を決定した。

## ブレーティング及びスクリーニング

表IIは、ブレーティングとブランクハイブリダイゼーションのデータを纏めたものである。フィルターをプライマーPC04で検知し、増幅とクローニングに起因する挿入部のパーセントを決定した。1206個のクリアーなブランク(クリアーなブランクの全数の90%)がプライマーにハイブリダイズした。15のブランクが $\beta$ -グロビンに特異的なブランクRS04にハイブリダイズした。増幅されたプライマーに陽性なブランクのうち $\beta$ -グロビンに陽性なブランクは約1%である。

表 II

ブ レ ー ト No	青色 ブ ラ ン ク	挿入 部 なし*	挿入 部 あり**	$\beta$ -グロ ビン挿入 部有り
1	28	25	246	1
2	29	18	222	2
3	11	26	180	0
4	24	20	192	5
5	22	27	185	5
6	39	21	181	3
合計	158	132	1206	15

増幅された配列を含有するブランクに対する $\beta$ -グロビン挿入部を含有するブランクの% =  $15 / 1206 \times 100 = 1.24\%$ 。

全ブランクに対する $\beta$ -グロビン挿入部を含有するブランクの% =  $15 / 1496 \times 100 = \text{約} 1\%$ 。

全ブランクに対する増幅された配列を含有するブランクの% =  $1206 / 1496 \times 100 = 80\%$ 。

\* プライマーPC04とハイブリダイズしないクリアーなブランク。

\*\* プライマーPC04とハイブリダイズするククリアーなブランク。

## 制限酵素及びサザン分析法

3つの $\beta$ -グロビン陽性ブランクと2つの $\beta$ -グロビン陰性ブランク(しかしPC04プライマー陽性)のファージDNAから少し調製したDNAを制限酵素分析法で分析した。増幅した $\beta$ -グロビン断片を含むM13クローンからのDNAのMst II



消化は特徴的な283塩基対断片を生ずる。Mst II消化の後、3つの $\beta$ -グロビン陽性クローンは全て予想のとおり283塩基対断片を生成し、一方プライマーとのみ陽性であった2つのクローンは大きい断片を生成した。

この分析からのゲルをMSIナイロンフィルターに移し、リグビーらによりJ.Mol.Biol.113巻237-51頁(1977年)に記載された標準的なニクストランスレーション法により調製した放射性ラベルを行ったニクストランスレーションした $\beta$ -グロビンプローブとハイブリダイズさせた。 $\beta$ -グロビンプローブとハイブリダイズできるバンドは、3つの $\beta$ -グロビン陽性クローンのみであった。2つの他のクローンは $\beta$ -グロビンプローブにハイブリダイズしない挿入部を有していた。

#### 配列の分析

$\beta$ -グロビン挿入部を含むことが制限酵素分析により示された10個の $\beta$ -グロビン陽性クローンを、M13ジデオキシ配列決定法を用いて配列決定した。10の内9つは $\beta$ -グロビンの野性型配列と同一であった。他のクローンは、 $\beta$ -グロビンプライマーでは非常に僅かしか増幅しないことが示されている $\delta$ -グロビン遺伝子と同じであった。

結論として、 $\beta$ -グロビン配列の増幅において、変形されたリンカープライマーは変形されていないプライマーとほぼ等しい効率を有していた。プライマーは、増幅されたDNAのクローニングベクターへの挿入を容易にすることができた。ゲノムの他のセグメントの増幅のため、1%のクローンのみがヘモグロビン配列を有していた。

10の内9つが公にされている $\beta$ -グロビン配列と同じであることが分かり、該技術はゲノムDNAを高い忠実度で増幅することを示した。1つのクローンは公表されている $\delta$ -グロビンと同一であったことが分かり、このことはプライマーが $\delta$ -グロビンに対する有意な配列相同性を持っているにもかかわらず、 $\beta$ -グロビン遺伝子に特異的であることを証明した。

クローニングを $\beta$ -グロビンの267塩基対断片を用いて行う場合、このクローニングはジメチルスルフォキシドが増幅工程に存在(37℃で10容量%)するときのみ効果的であることが分かった。

制限部位-修飾プライマーを使用して、ヒトN

-ras腫瘍遺伝子を増幅し、クローン化し、一部を配列決定することができ、更にHLA-DQ- $\alpha$ 及びDQ- $\beta$ 遺伝子の240塩基対断片をクローン化することもできた。これら全ての増幅は10容量%のジメチルスルフォキシドの存在下37℃で行った。HLA DQ- $\alpha$ 及びDQ- $\beta$ 遺伝子を増幅するためのプライマーは、臭化エチジウムで染色したアガロースゲル上に具体的なバンドを与えるというよりも汚れを生ずるにすぎない $\beta$ -グロビンやD.R- $\beta$ プライマーに比べて、それらの意図する標的物に対して遙かに特異的であった。更にHLA DQ- $\alpha$ プライマーは、所望のHLA標的断片を含む増幅される挿入部を有する20%までのクローンを生成し、ところが $\beta$ -グロビんクローンの1%が標的配列を含んでいた。HLA DQ- $\alpha$ 及びDQ- $\beta$ 遺伝子クローニングはDMSOが存在し高温のときにのみ効果的であった。

#### 実施例 13

本実施例は、それぞれ74塩基対の2つのオリゴヌクレオチドから出発して494塩基対のTNF遺伝子を調製するために本法を使用することを例示するものである。

#### プライマー

使用したプライマーは実施例2に記載した方法で調製し、それぞれ74塩基対を有し、下記に示すものである。

(TN10) 5'-CCTGCTCTACTOCCAGGTCCTCTTCAAGGCCA-AGGCTGCCCGACTATGTGCTCTCAOCCACAOCGTCAGCC-3'  
(TN11) 5'-GGCAGGGGCTCTTCAAGGCCAGAGAGGTTGA-CCTTCTOCTGGTAGGAGATGGCGAAGGGCTGACGGTGTGG-3'  
(LL09) 5'-CCTGGCCAATGGCATGGATCTGAAAGATAACCA-GCTGCTGGTGCCAGCAGATGGCCTGTACCTOCTCTACTOCC-3'  
(LL12) 5'-CTCCTGATAGATGGGCTCATACAGGGCTTGA-GCTCAGCCOCTCTGGGGTGTCTTGGGCGAGGGCTCTTG-3'  
(TN08) 5'-TGTAAGCAAAOCATCAAGTTGAGGAGCAGCTCGA-GTGGCTGAGOCAGGGGCAATGGOCTOCTGGCAATGGCA-3'  
(TN13) 5'-GATACTTGGGCAGATTGAOCTCAGOGCTGAGTT-GGTCAOCTTCTOCTAGCTGGAAGAOCCOCTOCTGATAGATG-3'  
(LL07) 5'-CCTTAAGATTATGCTCAGATCATCTTCTCAAAA-CTOGAGTGACAAGCTGTAGCCATGTTGTAGCAAAOCATC-3'  
(TN14) 5'-GCTCGGATCCTTACAGGGCAATGACTOCAAAGT-AGAOCCTGCCAGACTGGCAAAAGTGGAGATACTTGGGCAGA-3'

#### 全体的手順

I 下記に示す10サイクルのプロトコールを、プライマーとして下記ステップ(a)に概略を示すように相互作用をするプライマーTN10及び

各反応は100 $\mu$ lの、

各2mMのデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTP:

1×ポリメラーゼ緩衝液 (30mMのトリスアセテート、60mMの酢酸ナトリウム、10mMの酢酸マグネシウム、2.5mMのジチオスレイトール)；を含んでいる。

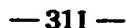
- 1 沸騰水中で1分、
- 2 室温冷却1分、
- 3 DNAポリメラーゼのクレノー断片 $1\mu\ell$  (5単位) 添加、

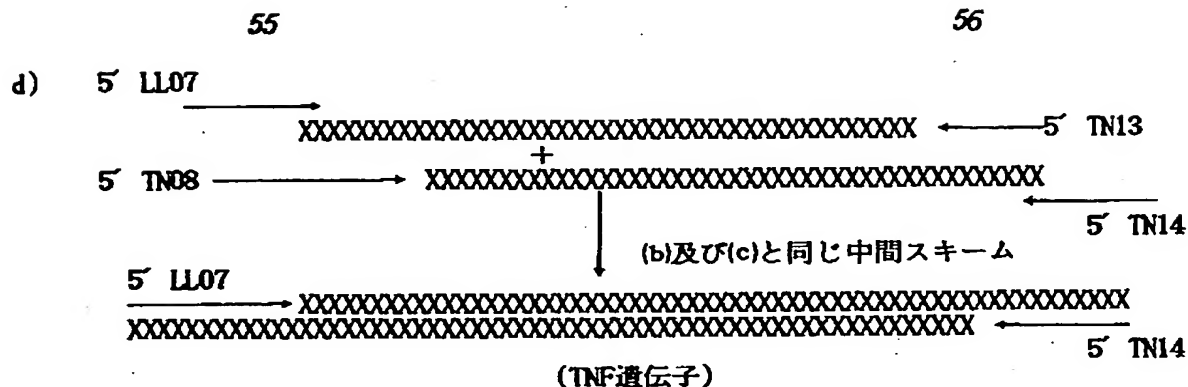
から成る。

次のサイクルは再度ステップ1) から始める。

**10**

15





### 材料の寄託

細胞系SC-1 (CTCC#0082) は、1985年3月19日、米国、20852、メリーランド州ロックビルパークロンドライブ12301に所在するアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) にATTT受審番号第CRL8756号として寄託された。SC-1の寄託は、ATCCと本特許出願人のシータス・コーポレーションとの間の契約に従って行われた。ATCCとの契約は、本寄託を記載しかつ特定する米国特許が発行された場合又は米国又は外国特許出願が公衆に公告された場合又は公開された場合のいずれか早い方が来たときにこの細胞系の子孫を公衆がそれを永続的に利用できるようにするために提供し、更に本細胞系を利用させることについては、米国特許商標局長官が米国特許法第122条及びそれに関する長官のルール (37 CFR1、14条も特に8860G638に関連して含む) に従って権限を持つて決定した人間に対しても行う。本出願の譲受人はもし寄託した細胞系が好適な条件下で培養したにもかかわらず、死滅し、失われ、損傷したときは通知を受けてから迅速に同じ細胞系の育成培養基と置き換えることに同意する。

總めると、本発明はまず1つ又はそれ以上の特定の核酸を、プライマーの伸長により生産される生成物が引き続き次のプライマーの伸長反応の鋳型としての役割を果たすような連鎖反応を用いて増幅させることにより核酸中の配列を検出するようにした方法を提供する。本法は当初にほんの僅かの量しか含まれていない核酸配列を検出するために特に有用である。更に増幅法は分クローニングにも使用することができる。

### 図面の簡単な説明

第1図は、増幅されることが望まれるヒトβ-グロビンの94塩基対長の配列を示すものであ

り、鎌状赤血球貧血に伴う単一塩基対変化を94merの下方に描いてある。第2図は、ヒトの野生型DNA中、及び正常のβ-グロビン遺伝子の1.9kbのBam HI断片を含むプラスミド (pBR328:HbAと示される) 中に含まれる上記94merの増幅を示す臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルの写真である。第3図は、pBR328:HbA、及びβ-グロビンの鎌状赤血球対立遺伝子の1.9kbBamHI断片を含有するプラスミド (pBR328:HbSと称する) 中に存在する特定の標的94mer配列のいずれかの増幅を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動のオートラジオグラフを示し、pBR328:HbAでは増幅されるべき配列がMst IIにより開裂され、そしてpBR328:HbSでは増幅されるべき配列が処理されたがMst IIにより開裂されなかった。第4図は、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる3サイクルについて、ヒトβ-グロビンの所望の94mer配列の増幅のためのポリメラーゼの連鎖反応のステップと生成物の詳細を示すものである。第5図は、pBR328:HbA中の240mer配列の4サイクル後の増幅を示す臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルを示す写真であり、ここはアリコートがNco I (レーン3)、Mst II (レーン4) 又はHinf I (レーン5) により消化される。レーン1は分量の基準で、レーン2は無傷の240bpの生成物を含んでいる。第6図は、Dde I 及びHinf I 制限部位間にある正常な (β<sup>A</sup>) β-グロビン遺伝子及び鎌状赤血球 (β<sup>S</sup>) β-グロビン遺伝子の配列を示すもので、β<sup>A</sup>についての1本線はDde I 部位 (CTGAG) の位置を示し、β<sup>A</sup>及びβ<sup>S</sup>についての2重線はHinf I 部位 ((GACTC) の位置を示している。第7図は、40merプローブ、並びにDde I 及びこれに続くHinf I 制限酵素を用いる正常β-グロビン

57

の逐次的な消化の結果を示すものである。第8図は、第7図と同じ40merプローブ並びにDde I 及びこれに続くHin f I 制限酵素を使用する鎌状β-グロビンの逐次的な消化の結果を示すものである。第9図は、増幅、プローブとのハイブリダイゼーション、及びDde I とHin f I による逐次的消化を受けた全ヒトDNAの試料中に存在するβ-グロビン対立遺伝子を特異的に特徴付けるための、第7図と同じ40merプローブの使用を示

58

す、臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルを示す写真である。第10図は、臭化エチジウムと紫外線を用いて視覚化した6%のNuシーブアガロースゲルの写真を示すものである。この写真は、110-bp増幅生成物のサブフラグメントの増幅を示し、このサブフラグメントは110bp断片内の内部ネストである。

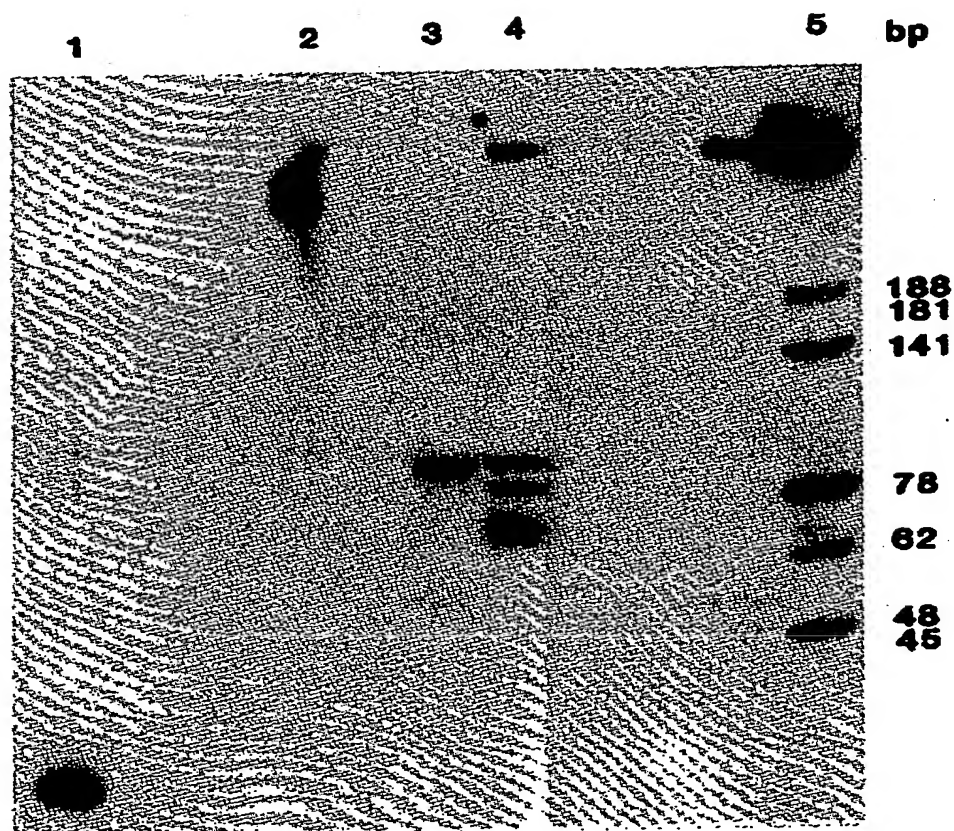
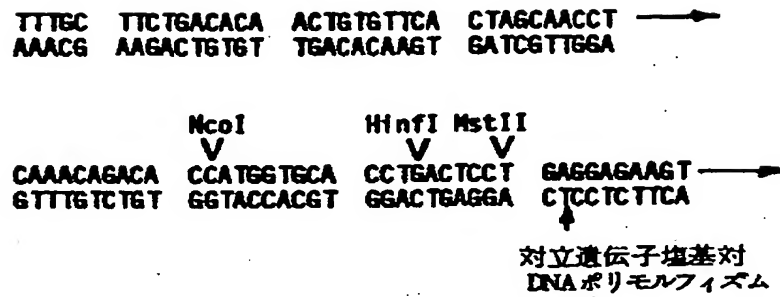


FIG.2

FIG.1

2重鎖94-bp配列



CTGCCGTTAC TGCCCTGTG  
 GACGGCAATG ACGGGACAC

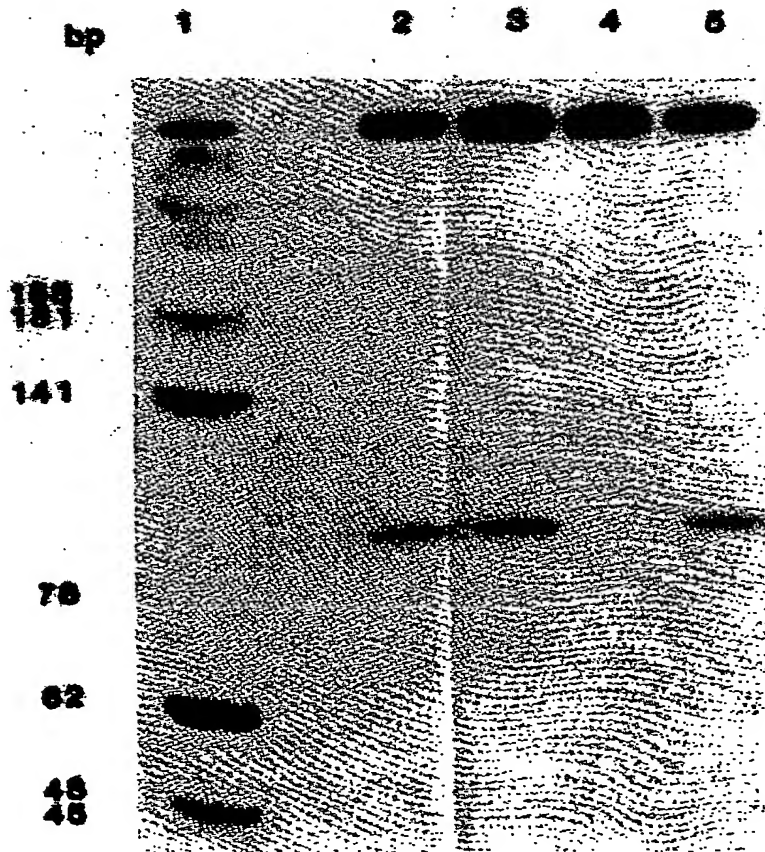


FIG.3

ヒト-β-グロビン FIG.4-1

0 ...CGTCTGTTG CTTCAGTTC ACTGAGAAC ACTGAGTTC TGAGGAGAG TCTGCGTTA CTGCGTTG GCGGAGTTC AGTTGTTG...  
 101 111 121 131 \*\*\* 161 171 181 191 201 211 221  
 0 ...GTTAGTAC GAGTGTAC GAGTGTG TTGAGTTC TGAGTTC ACTGCTTC AGAGGAT GAGGAGC CCGTTCAC TTGAGGAC...  
 +  
 CAGGCGAGTAC PC01  
 +  
 TTGCTGAGACA PC02

! 変性、再アニール  
 ↓

0 ...CGTCTGTTG CTTCAGTTC ACTGAGAAC ACTGAGTTC TGAGGAGAG TCTGCGTTA CTGCGTTG GCGGAGTTC AGTTGTTG...  
 5' PC02 TTG CTTCAGTTC A → 伸長  
 1 ...GTTAGTAC GAGTGTAC GAGTGTG TTGAGTTC TGAGTTC ACTGCTTC AGAGGAT GAGGAGC CCGTTCAC TTGAGGAC...  
 伸長 ← GAGGAGC 5' PC01

! ポリメラーゼ、dNTPs  
 ↓

0 ...CGTCTGTTG CTTCAGTTC ACTGAGAAC ACTGAGTTC TGAGGAGAG TCTGCGTTA CTGCGTTG GCGGAGTTC AGTTGTTG...  
 1 ...GTTAGTAC GAGTGTAC GAGTGTG TTGAGTTC TGAGTTC ACTGCTTC AGAGGAT GAGGAGC CCGTTCAC TTGAGGAC...  
 1 TTG CTTCAGTTC ACTGAGAAC ACTGAGTTC TGAGGAGAG TCTGCGTTA CTGCGTTG GCGGAGTTC AGTTGTTG...  
 0 ...GTTAGTAC GAGTGTAC GAGTGTG TTGAGTTC TGAGTTC ACTGCTTC AGAGGAT GAGGAGC CCGTTCAC TTGAGGAC...  
 伸長 ← GAGGAGC 5' PC01

! 変性、再アニール  
 ↓

0 ...CGTCTGTTG CTTCAGTTC ACTGAGAAC ACTGAGTTC TGAGGAGAG TCTGCGTTA CTGCGTTG GCGGAGTTC AGTTGTTG...  
 5' PC02 TTG CTTCAGTTC A → 伸長  
 1 ...GTTAGTAC GAGTGTAC GAGTGTG TTGAGTTC TGAGTTC ACTGCTTC AGAGGAT GAGGAGC CCGTTCAC TTGAGGAC...  
 伸長 ← GAGGAGC 5' PC01

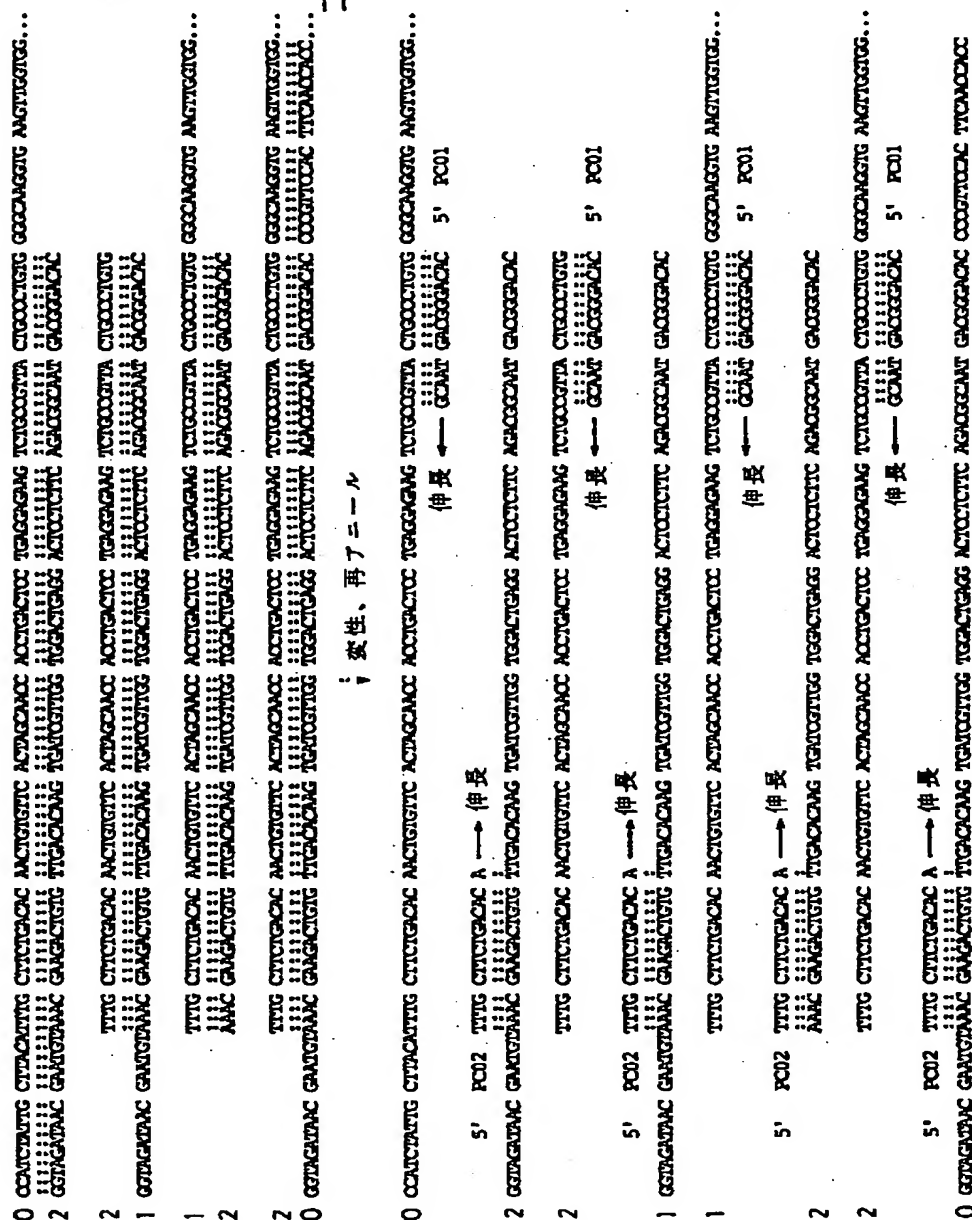
2

0 ...CGTCTGTTG CTTCAGTTC ACTGAGAAC ACTGAGTTC TGAGGAGAG TCTGCGTTA CTGCGTTG GCGGAGTTC AGTTGTTG...  
 5' PC02 TTG CTTCAGTTC A → 伸長  
 1 ...GTTAGTAC GAGTGTAC GAGTGTG TTGAGTTC TGAGTTC ACTGCTTC AGAGGAT GAGGAGC CCGTTCAC TTGAGGAC...  
 伸長 ← GAGGAGC 5' PC01



FIG. 4-2

ポリメラーゼ活性





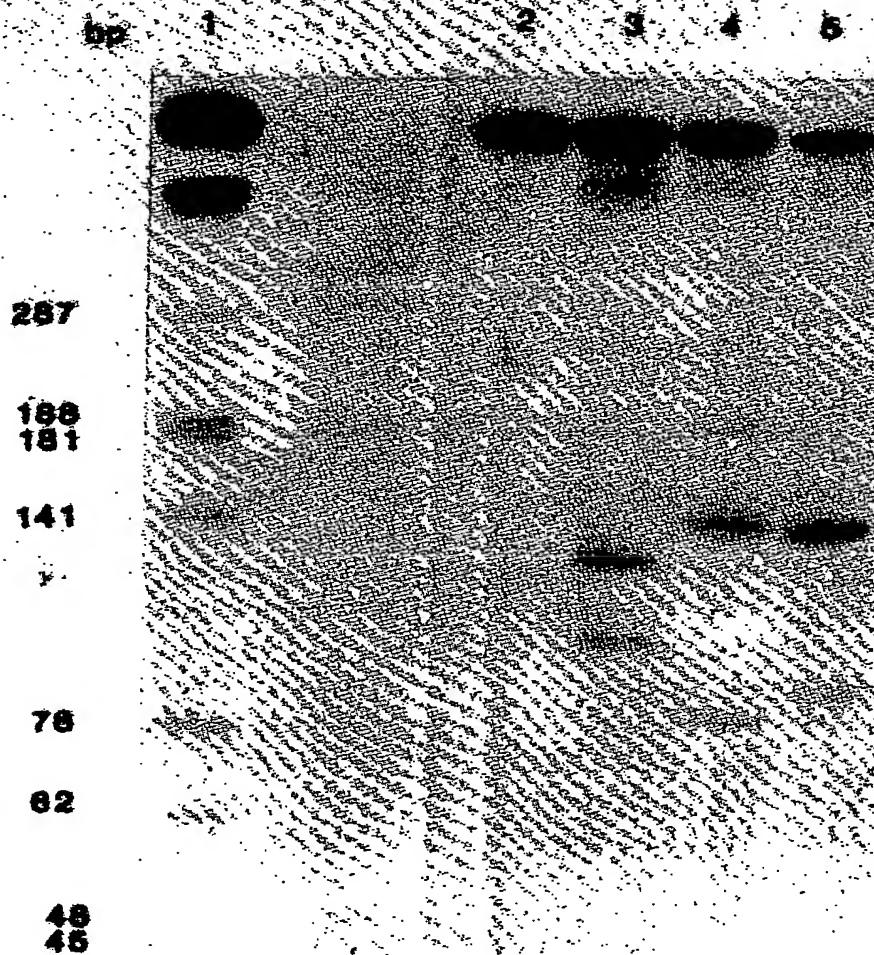


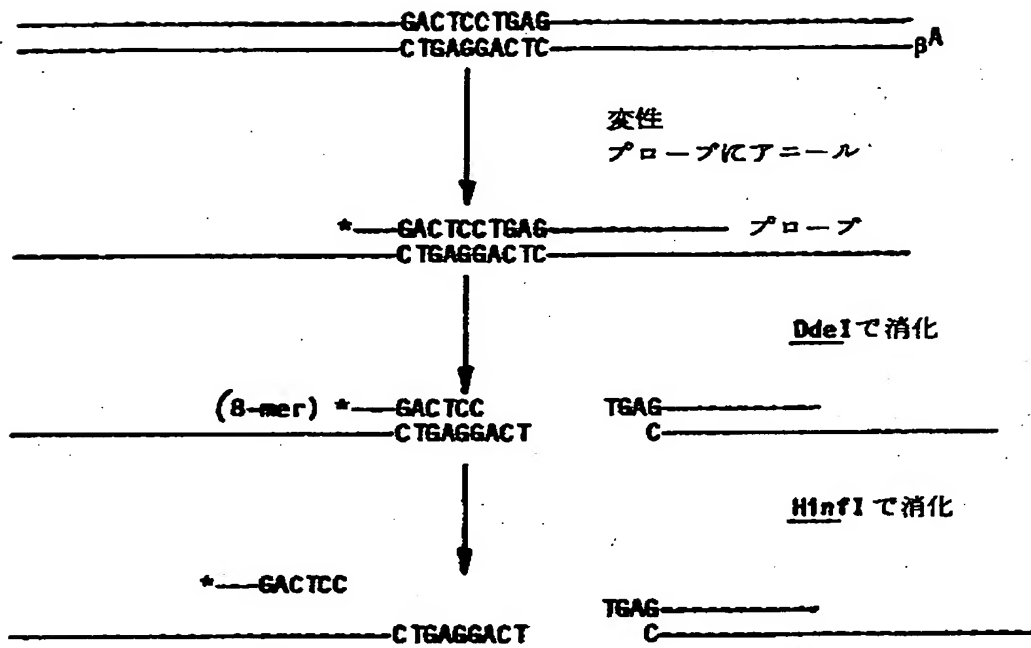
FIG.5

FIG.6

$\beta^A$ 
  
 CA TGG TGC ACC TGAC TCC TGAGGAGAAG TC TGCCG TTAC TGCCCTG TGGGGCAAGG TGAA
   
 G TACCACG TGGAC TGAGGAC TCC TC TTCAGACGGCAA TGACGGGACACCCCG TTCCAC TT

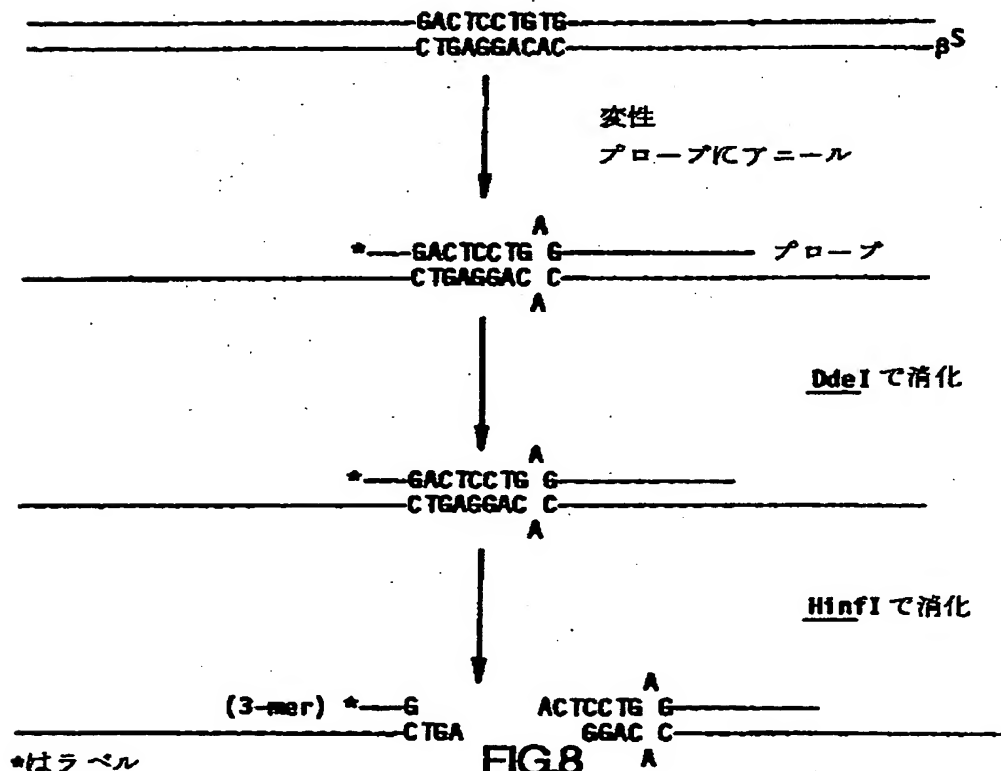
$\beta^S$ 
  
 CA TGG TGC ACC TGAC TCC TG TGGAGAAG TC TGCCG TTAC TGCCCTG TGGGGCAAGG TGAA
   
 G TACCACG TGGAC TGAGGACACC TC TTCAGACGGCAA TGACGGGACACCCCG TTCCAC TT

•印は、鎌状赤血球貧血遺伝子中の DdeI 部位を中断する変異 (A→T)



\*はラベル

FIG.7



\*はラベル

FIG.8

FIG. 9

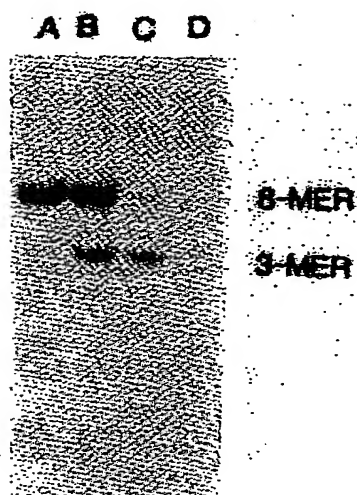


FIG. 10

